

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CL. REGAUD

(1870-1940)

Claudius Regaud, né à Lyon le 30 janvier 1870, est mort le 29 décembre dernier, à Couzon-au-Mont-d'Or, dans le département du Rhône, où il était retiré depuis un an et demi. Lyonnais pur sang, il avait les qualités qu'on retrouve assez fréquemment dans cette région : le sérieux, la persévérance, la probité. Dans sa carrière, pas un titre, pas un grade acquis par sollicitation, combinaison ou influence ; pas un titre, pas un grade acquis autrement que par le travail.

En embrassant les grandes lignes de son évolution, on y reconnaît les circonstances principales qui l'ont orientée : nommé interne des Hôpitaux de Lyon en 1891, il interrompt momentanément, l'année suivante, ses fonctions hospitalières pour venir suivre, à l'Institut Pasteur de Paris, le cours de

microbiologie ; il s'y fait connaître de M. Roux, dans le service duquel il travaille. Revenu à Lyon, il entre au laboratoire d'Anatomie générale et d'Histologie de la Faculté de Médecine où le talent didactique et la forte personnalité du professeur J. Renaut attiraient de nombreux élèves. Il y prépare sa thèse de médecine sur « Les vaisseaux lymphatiques du testicule ». Cette étude le spécialise dans l'étude microscopique des gonades, d'autant plus que Renaut lui confie la rédaction du chapitre « glandes génitales » de son *Traité d'Histologie pratique*. En 1901, Regaud est nommé, pour neuf ans, au concours d'Anatomie et de Physiologie, agrégé d'Histologie à la Faculté de Médecine de Lyon.

Une deuxième période de sa vie scientifique commence, pendant laquelle il partage toute son activité entre l'enseignement et la recherche. Il possédait un admirable talent d'exposition ; ses cours, même lorsqu'ils portaient sur des sujets aussi ardues que l'embryologie, par exemple, avaient tant de clarté et d'intérêt qu'ils ont suscité des vocations scientifiques.

Il est peu de questions d'histologie et de cytologie qu'il n'ait abordées avec une technique impeccable et au moyen de procédés ingénieux qu'il imaginait. Tous les cytologistes connaissent la technique de coloration des mitochondries, dite « technique de Regaud », qui, chose rare en pareille matière, a résisté au temps, puisqu'elle continue à être utilisée partout, après plus de trente ans.

Cependant, les rayons X, devenus depuis quelques années un moyen d'expérimentation biologique, s'étaient montrés capables d'agir sur le testicule. Regaud voit immédiatement les avantages que pourrait fournir cette propriété pour la solution de certains problèmes d'histophysiologie de la lignée séminale. En 1906, il découvre la radiosensibilité particulièrement marquée que présente la spermatogonie, souche de la lignée, et dont l'atteinte sélective fournit l'explication de tous les phénomènes de stérilisation temporaire ou définitive du testicule par les rayons X. Ce mécanisme, il le retrouve dans

des lignées cellulaires d'autres organes. Comme la peau se prête bien à une semblable étude, Regaud précise les meilleures conditions de sa stérilisation sélective, aboutissant à la lésion devenue classique qu'il a appelée la « radioépidermite exsudative ». Enfin, en raison de certaines analogies de développement que les tissus néoplasiques malins ont avec les lignées cellulaires normales, il veut tenter d'appliquer à la thérapie du cancer les règles radiobiologiques qu'il a découvertes : au laboratoire, avec son installation de fortune, il irradie certains malades incurables que lui envoient ses collègues des Hôpitaux ; il étudie chaque cas avec la méthode et la minutie dont sa longue pratique des expériences de laboratoire lui a fait une discipline. Déjà, il obtient quelques succès encourageants.

Mais le moment approche où son temps d'agrégation va être révolu. En 1909, le Conseil de la Faculté le maintient bien en fonction pour trois nouvelles années. Néanmoins, en ce temps-là, la situation des agrégés offrait, malgré tout, un caractère un peu précaire. Aussi acceptera-t-il la proposition qu'en 1912 il a la surprise de recevoir de M. Roux, directeur de l'Institut Pasteur de Paris : il s'agit de prendre la direction d'un laboratoire de Radiophysiologie dans le nouvel Institut du radium que l'Université de Paris et l'Institut Pasteur ont décidé de créer et d'entretenir à frais communs.

Donc, à la rentrée d'octobre 1913, grand changement d'existence : le provincial est devenu un habitant de Paris ; cependant au laboratoire en voie d'achèvement, sur la montagne Sainte-Geneviève, Regaud se prépare à reprendre la même vie simple de travailleur scientifique qu'il mène depuis plus de vingt ans. Mais ce ne sera pas pour longtemps !

A peine venions-nous, lui et moi (son préparateur de Lyon à qui il avait offert de tenter sa chance à Paris) de commencer, en juillet 1914, nos premières expériences, que l'ordre de mobilisation vint le laboratoire à peine ouvert.

Regaud, vibrant patriote, part aux armées comme médecin-chef d'un hôpital d'évacuation. Dans cette nouvelle fonction,

de même que partout où il est passé, il se distingue par la conscience qu'il apporte à accomplir toutes les obligations de sa tâche. Aussi Justin Godart, lorsqu'il est nommé sous-secrétaire d'Etat en 1913, fait-il appel à lui pour mener à bien les réformes indispensables dans l'organisation du Service de Santé. C'est à Regaud qu'on doit, en grande partie, la création des équipes chirurgicales et des ambulances automobiles chirurgicales. Mais il n'est pas fait pour vivre longtemps dans les atmosphères ministérielles. Au cours d'une guerre qui s'éternise, il a vu les changements rapides qu'ont subi les idées relatives au traitement des plaies. Il lui semble nécessaire que tous les médecins et chirurgiens du front, disséminés dans les formations sanitaires des corps d'armée et appelés à donner les premiers soins aux blessés, soient initiés aux progrès de cette chirurgie spéciale. Sous l'uniforme, l'esprit du professeur demeure. Regaud demande donc d'être chargé d'organiser, près du front, un grand centre thérapeutique modèle, qui servira à l'enseignement des médecins mobilisés ; ceux-ci s'y rendront à tour de rôle pour y suivre une sorte de cours de perfectionnement. Ce fut ce que certains ont appelé « l'Université de Bouleuse ». Le médecin-chef y nouera des relations avec de nombreux cliniciens ; il s'y retrempera dans des sujets de thérapeutique.

En fin 1918, Regaud rentre au petit pavillon de la rue Pierre-Curie. Mais il arrive avec des dispositions bien différentes que cinq ans auparavant. Il veut profiter de la période de facilité et de prospérité qu'amènera, pense-t-il, la reconstruction du pays. Le laboratoire doit devenir le grand Institut de recherche et de thérapeutique par les radiations, dont il a longuement muri le plan. Il s'est assuré le concours de nouveaux collaborateurs recrutés parmi le personnel qu'il a eu sous ses ordres aux armées ; son équipe est toute prête. Il a maintenant de nombreuses relations dans le milieu médical parisien. Sans peine, il rallie à sa façon de voir le grand esprit aux vues lucides qu'était M. Roux ; celui-ci lui apporte tout son appui. Une consultation pour malades can-

céreux est ouverte à l'Institut Pasteur et un petit service de traitement par le radium est aménagé à l'Hôpital Pasteur. Le travail y est immédiatement fructueux. Un matériel curie-thérapique nouveau est créé : aiguilles à radiumpuncture, tubes standard quant à leur teneur en radium et à leur filtration, pâte modelable spéciale pour servir de support dans les applications juxta-cutanées, etc... Les principes que l'expérimentation radiobiologique avait permis d'établir (emploi d'un rayonnement aussi sélectif que possible, bonne répartition de celui-ci par la multiplication des foyers et des portes d'entrée, allongement de la durée du traitement et continuité de celui-ci jusqu'à l'administration de la dose totale, etc...) sont appliqués avec succès aussi bien en curie- qu'en roentgenthérapie. Lorsque le recul du temps sera devenu suffisant, les résultats thérapeutiques seront publiés sous forme de statistiques, présentées avec une rigueur irréprochable ; elles démontreront que les cancers de certaines structures et de certaines localisations, comme les épithéliomas du col utérin et de la langue, sont devenus curables dans de fortes proportions.

Mais les locaux, tant ceux où se font les recherches que ceux qui servent pour les traitements, sont devenus insuffisants. Des pavillons pour les consultations et pour les services de roentgenthérapie sont d'abord construits ; puis seront édifiés : un nouveau bâtiment pour des laboratoires (avec le produit d'un don fait par un anonyme), enfin l'Hôpital Curie. Regaud a mené son œuvre à bien ; il a réalisé son rêve. Son Institut, de renommée mondiale, dispose des moyens indispensables au travail, sert de centre d'enseignement pour des médecins spécialistes venus de tous pays, les techniques qui y ont été établies sont généralement adoptées.

Hélas ! Regaud n'allait pas jouir longtemps de ces réalisations. Depuis un certain nombre d'années s'étaient manifestés des symptômes d'abord larvés, puis de plus en plus manifestes d'une maladie chronique progressive. Avec une conscience complète du sort qui l'attendait, cet homme

d'action et de travail se vit privé d'abord de la commande de ses mouvements, ce qui l'empêcha de se servir de son microscope, puis de la vision, ce qui lui interdit la lecture. A la campagne où il s'était retiré, un sort cruel et injuste continua de s'acharner sur lui : frappé dans sa santé, frappé dans sa patrie, il fut encore frappé dans sa famille et eut à subir l'immense douleur de la perte d'un de ses fils. Il attendit la mort avec une sereine résignation, dans la certitude qu'il avait d'un monde meilleur et du retour de jours heureux pour son pays et pour les siens.

A. LACASSAGNE.

OBSERVATIONS SUR LES CAUSES MODIFICATRICES DE L'ÉVOLUTION DE LA RAGE CHEZ LES LAPINS INOCULÉS AVEC LE VIRUS FIXE

par VICTOR GRYZEZ.

(Institut Pasteur de Lille.)

En 1935, dans ces *Annales* (numéro commémoratif sur la rage, 25 octobre 1935, p. 151 à 156), nous avons indiqué la technique que nous suivions à Lille pour conserver le virus fixe de Pasteur en lui gardant, dans la majorité des cas, les caractères qu'il possédait en 1895.

Depuis 1935, nous avons fait 54 nouveaux passages de ce virus (1.918^e passage le 19 septembre 1940) en observant les précautions décrites, et dans 70 p. 100 des cas environ, l'évolution de la rage chez les lapins inoculés reste inchangée. Le pourcentage des évolutions anormales (en général, exaltation de la virulence) est cependant encore élevé, aussi en avons-nous cherché la cause.

Chacun des lapins inoculés a une fiche sur laquelle on note :

- 1° Son numéro, son poids et le mode d'inoculation ;
- 2° Le numéro du lapin ayant fourni le cerveau de passage ;
- 3° Renseignements sur la conservation de ce cerveau, notamment nature de la glycérine, temps de séjour dans la glycérine, température à laquelle s'est faite la conservation ;
- 4° Indications journalières sur l'évolution de la rage chez ce lapin, pour pouvoir la comparer avec l'évolution normale qui est : lapin *bien portant* les trois premiers jours, *malade* le quatrième jour, *partiellement paralysé* le cinquième jour, *totalement paralysé* (couché) les sixième et septième jours, *mort* le huitième ou le neuvième jour.

Pour faciliter les comparaisons, nous reportons ces cinq derniers renseignements sur un graphique dont les abscisses sont les jours et dont les ordonnées ont cinq paliers correspon-

nant à ces cinq états de l'évolution de la maladie. Sur chaque fiche, un graphique en pointillé rappelle l'évolution normale, les différences sont ainsi évidentes.

Nous bornerons nos constatations actuelles à la période du 13 mars 1939 au 19 septembre 1940.

Pendant ces dix-huit mois, 90 lapins ont été inoculés, dont 68, c'est-à-dire 75,5 p. 100 ont eu une évolution normale de la rage. Les 22 autres ont eu une évolution anormale : un est mort le quatrième jour, 5 sont morts le cinquième jour, 15 le sixième jour et 1 le septième jour.

Ces 90 lapins ont été inoculés par paires ; on a donc chaque

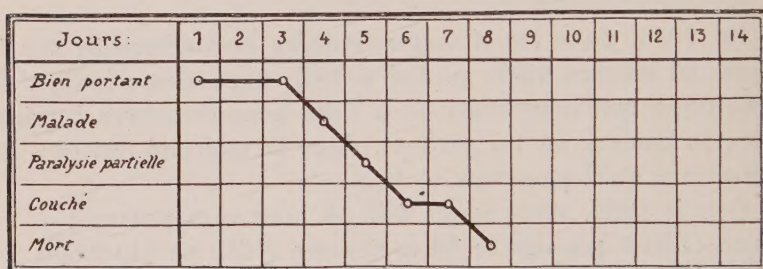


FIG. 1. — Graphique de l'évolution normale de la rage.

fois 2 lapins qui reçoivent, au même moment, la même quantité d'une même émulsion de virus. Or, sur ces 45 paires de lapins, on en a eu 29 où l'évolution de la rage a été la même pour les 2 lapins (26 fois normale, 3 fois anormale). Dans les 16 autres paires, un des lapins a eu une évolution normale, l'autre une évolution anormale.

INFLUENCE DE LA GLYCÉRINE SUR LE VIRUS. — Les cerveaux sont conservés dans de la glycérine pure ; nous avons quelquefois employé de la glycérine neutralisée et tamponnée.

Sur 84 lapins inoculés avec des cerveaux conservés dans de la glycérine pure, 64 (soit 76 p. 100) ont eu une évolution normale de la rage.

Sur les 6 autres animaux inoculés avec des cerveaux conservés dans de la glycérine neutralisée et tamponnée, 4 (soit 66 p. 100) ont une évolution normale.

L'emploi de l'une ou l'autre de ces deux sortes de glycérine, pour un cerveau, ne semble donc pas avoir une grande importance sur l'évolution de la rage transmise par ce virus.

Cependant, nous avons renoncé à l'emploi de la glycérine neutralisée et tamponnée parce que, plusieurs fois, nous avons observé, sur les lapins inoculés avec des cerveaux ainsi conservés, une période d'excitation immédiate et durant cinq ou six jours ; cette excitation gênait les observations sur l'évolution de la rage chez ces animaux.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CONSERVATION DU VIRUS.

— Avec des cerveaux conservés à $+ 23^{\circ}$, on a eu 60 p. 100 d'évolutions normales ;

Avec des cerveaux conservés à $+ 4^{\circ}$, on a eu 40 p. 100 d'évolutions normales ;

La conservation à $+ 4$ semble exalter la virulence du virus rabique et favoriser ainsi une évolution anormale de la rage.

INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA CONSERVATION EN GLYCÉRINE. —

Dans les limites de vingt-cinq à cinquante jours, la durée du séjour en glycérine n'a aucune influence sur l'évolution de la rage transmise.

INFLUENCE DE L'ÂGE DU VIRUS. — Il ne semble pas que l'âge du virus, c'est-à-dire le nombre des passages qu'il a subis depuis son origine, modifie l'évolution de la rage qu'il provoque chez le lapin. Ainsi, sur les 14 passages se rapportant à la période envisagée, nous avons eu :

	POURCENTAGE d'évolutions normales
Pour le 1.904 ^e passage	60
Pour les 1.905 et 1.906 ^e passages	87
Pour le 1.907 ^e passage	100
Pour le 1.908 ^e passage	66
Pour le 1.909 ^e passage	100
Pour le 1.910 ^e passage	60
Pour les 1.911 et 1.912 ^e passages	50
Pour le 1.913 ^e passage	75
Pour le 1.914 ^e passage	100
Pour les 1.915 ^e et 1.916 ^e passages	66
Pour le 1.917 ^e passage	60

De toutes ces observations on peut conclure que, dans les limites indiquées, nous n'avons pas pu trouver la cause des variations d'évolution de la rage dans les variations du virus.

Cela nous amènerait à chercher cette cause chez les animaux employés. A cet égard, nos fiches, jusqu'ici, ne nous renseignaient que sur le poids de l'animal.

Nous remarquons que le poids moyen des lapins à évolution normale est de 2.285 grammes, tandis que le poids moyen des lapins à évolution anormale est de 2.215 grammes. Cette différence, et d'autres analogues que nous avons pu constater par d'autres comparaisons, nous semblent trop peu importantes pour expliquer les variations d'évolution observées.

D'ailleurs, on a eu des lapins de même race et de même poids qui, inoculés en même temps avec le même virus, ont présenté une évolution différente de leur maladie.

Ces différences d'évolution dépendent peut-être de l'état de santé du lapin, de son hypersensibilité ou de son immunité naturelle, toutes choses qu'on pourrait chercher à mettre en évidence chez les animaux destinés à servir aux inoculations rabiques.

MODIFICATIONS
DE LA VIRULENCE DU BACILLE TUBERCULEUX BOVIN
AU COURS DES RÉENSEMENCEMENTS SUCCESSIFS
SUR POMME DE TERRE BILIÉE

par F. van DEINSE.

(*Institut Pasteur. Laboratoires de recherches
sur la tuberculose.*)

Au cours de l'atténuation progressive de sa virulence, le bacille bilié de A. Calmette et C. Guérin, universellement connu aujourd'hui sous les initiales BCG, a montré certaines variations curieuses dans son pouvoir pathogène pour les différentes espèces animales, qu'on trouve mentionnées dans les publications de ces auteurs (1), et que nous voudrions d'abord résumer ici.

Ce fut au cours de leurs expériences sur l'infection des bovidés par voie digestive, que A. Calmette et C. Guérin eurent l'idée de cultiver le bacille tuberculeux bovin dont ils se servaient pour ces recherches, sur pomme de terre biliée. Ils avaient observé, en effet, que le succès de ces expériences dépendait beaucoup du degré de dispersion des bacilles, émulsionnés dans de l'eau physiologique, et qu'il fallait, pour avoir des suspensions extrêmement fines, broyer les cultures dans un mortier d'agate avec du jaune d'œuf, ou, mieux encore, avec de la bile de bœuf. L'idée leur était donc venue d'ensemencer leur bacille sur des tranches de pomme de terre, cuites

(1) CALMETTE (A.) et GUÉRIN (C.). *C. R. Acad. des Sciences*, **147**, 1908, p. 1456 ; *C. R. Acad. des Sciences*, **149**, 1909, p. 716 ; *C. R. Acad. des Sciences*, **151**, 1910, p. 32 ; ces *Annales*, **25**, 1911, p. 162. — CALMETTE (A.). Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. *Royal Soc. of Med.*, sect. f. the st. of dis. in Children, June 9, 1931. — NATTAN-LARRIER (L.). *Traité de Microbiologie*, **1** (Doin et C^{ie}, éd., Paris, 1931). Bacille tuberculeux bovin, par C. Guérin, p. 888.

dans de la bile de bœuf glycérinée, pour que la culture ainsi produite se laisse plus aisément émulsionner. Ils constatèrent que leur bacille poussait très bien sur ce milieu extrêmement alcalin, sous forme d'un enduit crémeux, rappelant l'aspect d'une culture du bacille de la morve.

La souche bovine, employée par les auteurs, avait été isolée en 1902 par Nocard d'une mamelle de vache tuberculeuse ; elle était connue au laboratoire d'Alfort sous la dénomination de « souche lait Nocard ». C'est le 7 février 1908 qu'elle fut ensemencée pour la première fois sur pomme de terre biliée. A ce moment la souche possédait une virulence très marquée : inoculée sous la peau du cobaye à la dose de 1/10 000 de milligramme, elle tuait cet animal ou le tuberculisait gravement en soixante jours.

Au cours des réensemencements successifs sur le milieu bilié, la culture a commencé par perdre sa virulence pour les bovidés : au dixième passage sur bile, une injection intraveineuse de 50 milligrammes produisait une infection généralisée d'allure typhique, sans lésions folliculaires et non mortelle. Chez les jeunes bovidés, 3 milligrammes de la culture biliée du vingtième passage, injectés dans les veines, ne produisaient plus que des lésions chroniques, et, au trente-quatrième passage, le bacille bilié pouvait être injecté dans les veines du bœuf sans provoquer de lésions. Par contre, 3 milligrammes de cette même culture de trente-quatrième passage sur bile, injectés par voie intraveineuse chez le cheval ou l'âne, causaient la mort de ces animaux en vingt-cinq à trente jours par granulie pulmonaire suraiguë, alors que le bacille bovin primitif non modifié donnait des résultats inconsistants chez les équidés. Au quarante-deuxième passage, le bacille bilié était encore extrêmement virulent pour le cheval, tandis qu'une injection de 100 milligrammes de la culture de ce même passage 42 dans les veines des bovidés était suivie d'une typhobacillose, qui guérissait au bout d'un mois environ. Cependant, dans les ganglions bronchiques de ces bovidés guéris cliniquement, on trouvait encore longtemps des bacilles vivants.

Pour le lapin, la virulence était encore très prononcée au vingtième passage : l'animal mourait en quinze à vingt jours

d'une tuberculose « Yersin », après une injection intraveineuse de 0 milligr. 01, mais déjà au vingt-huitième passage, la virulence pour le lapin avait beaucoup diminué (les auteurs ne donnent pas de détails).

Pour le cobaye enfin, après une certaine exaltation de la virulence au cours des premiers passages sur bile, celle-ci a bientôt commencé à tomber. Ainsi il est rapporté, qu'au quinzième passage, des cobayes, qui avaient reçu une dose de 1 milligramme par voie intrapéritonéale, étaient encore en bonne santé apparente cinq mois plus tard, et que d'autres cobayes, infectés par voie sous-cutanée avec 1 milligramme de la culture de ce passage, n'ont présenté qu'un léger gonflement inguinal vers le quarantième jour, mais sont restés en bonne santé. Par contre, au vingtième passage, 0 milligr. 01, injecté dans le péritoine du cobaye, provoqua encore des lésions énormes de l'épiploon, où les bacilles fourmillaient, ainsi que dans la rate, qui était triplée de volume. Au trente-quatrième passage, le bacille était toujours virulent pour le cobaye, mais au quarante-deuxième passage, les auteurs notent qu'il est devenu avirulent, cette fois-ci définitivement.

Deux choses nous frappent, dans cet aperçu : d'une part, la tendance qu'acquiert le bacille bilié, à donner aux bovidés une maladie fébrile, une « typhobacillose », évoluant en quelques semaines vers la guérison, même après une inoculation intraveineuse massive. D'autre part, on voit que le bacille, qui, avant d'avoir été cultivé sur bile, avait un pouvoir pathogène inconstant pour les équidés, devient, vers le trente-quatrième passage sur bile, d'une virulence extrême pour le cheval et pour l'âne. Ces deux caractères nouveaux dans le comportement de ce bacille bovin, apparus à la suite d'un certain nombre de passages sur la pomme de terre biliée, tendent à lui donner, au début de la longue série de ses passages successifs sur bile, une certaine ressemblance avec le bacille aviaire. [On sait que le bacille tuberculeux aviaire se distingue par un pouvoir pathogène à caractère « toxique » spécial, sur lequel nous avons eu l'occasion d'insister à plusieurs reprises (2), et que l'injection intraveineuse de bacilles

(2) Ces *Annales*, 63, 1939, p. 443.

aviaires chez les chevaux est très pathogène (3).] Par la suite, la virulence du bacille bilié n'a cessé de diminuer, et au cent quatre-vingt-dix-huitième passage (en 1919), il était devenu tout à fait avirulent pour le cobaye, le lapin, le cheval et le bœuf.

C'est ce caractère de « toxicité » passagère, remarqué chez le bacille bilié aux débuts de son atténuation sur bile, qui nous a donné l'idée de chercher à le reproduire chez d'autres souches de tuberculose bovine, réensemencées en série sur pomme de terre biliée. Pour l'expérimentation, nous nous sommes adressé aux petits animaux, cobayes, lapins et poules.

Ces recherches ne sont pas terminées ; le nombre de passages sur bile de nos souches ayant à peine dépassé la centaine. Mais les circonstances actuelles ont imposé un arrêt provisoire aux expériences sur les animaux de laboratoire, et nous en profitons pour essayer de faire une mise au point, et de dégager de l'ensemble de nos recherches quelques faits qui semblent mériter d'être mentionnés.

Nous avons utilisé pour ces expériences 3 souches bovines. Ce sont : la souche H, isolée en 1932 par H. D. Boer, à Leyde (Pays-Bas) du liquide de lavage d'estomac d'un enfant tuberculeux (4) ; la souche B-I, isolée en juin 1933 par nous-même d'un ganglion de bœuf tuberculeux ; la souche Porc, isolée également par nous d'un ganglion de porc tuberculeux le 23 octobre 1936 ; la souche B-XIII et la souche B-XIV, isolées par nous en novembre 1936 des ganglions de deux vaches tuberculeuses. Les animaux dont provenaient ces différents produits tuberculeux avaient été abattus à l'abattoir de Vau-

(3) CALMETTE (A.). *L'infection bacillaire et la tuberculose*, 4^e éd., 1936, p. 76. Il est intéressant de rappeler, à ce propos, que A. Calmette et C. Guérin et, après eux, H. Vallée, se sont servis, en 1906 et 1907, d'un bacille tuberculeux d'origine équine, pour des essais de vaccination ; ce bacille, peu virulent pour le cobaye et pour le lapin, provenait vraisemblablement d'un cas de tuberculose du cheval observé par Nocard en 1896. Ses caractères étaient très voisins de ceux du bacille de type aviaire. (A. Calmette, *loc. cit.*, p. 863 et 875.)

(4) Cette souche, entretenue simultanément sur pomme de terre glycélinée, sur pomme de terre biliée et sur Sauton, a perdu sa virulence sur pomme de terre glycélinée à un moment où sa virulence sur pomme de terre biliée n'était encore que diminuée, et a gardé sa virulence intacte sur Sauton ; voir *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 36.

girard. Toutes ces 5 cultures avaient une virulence caractéristique pour le cobaye et le lapin.

Nous commencerons par dire que les poules, inoculées avec certains passages de ces cultures sur pomme de terre biliée, n'ont jamais présenté le moindre signe de tuberculose ; par conséquent, si par quelques caractères ces cultures peuvent se rapprocher, à certains moments, de celles du bacille aviaire, il n'y a nul lieu de penser à une réelle transformation de type. Nous ne reproduirons donc aucun protocole, ayant trait à ces inoculations aux poules, pour ne pas allonger inutilement ce mémoire.

Nous nous bornerons à décrire, dans ce mémoire, deux phénomènes qui nous ont frappé au cours des réensemencements successifs de nos cultures sur pomme de terre biliée, qui ont eu lieu régulièrement tous les quinze jours. Le premier de ces phénomènes est la dissociation qui se produit après un certain nombre de passages sur bile, entre le pouvoir pathogène de ces cultures biliées pour le cobaye et pour le lapin. Le deuxième, c'est le caractère « toxique » que prend ce pouvoir pathogène pour le lapin dans certains cas. Nous donnons quelques exemples de ces deux phénomènes.

1. DISSOCIATION ENTRE LE POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE COBAYE ET POUR LE LAPIN.

Souche bovine H, 55^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye, inoculé par voie sous-cutanée avec 0 milligr. 01, meurt après trois mois et demi d'une pneumonie : il a un gros ganglion caséeux inguinal, rien par ailleurs.

1 cobaye reçoit la même dose par la même voie et est sacrifié quatre mois plus tard : il a un abcès inguinal du côté inoculé, rien par ailleurs, les ganglions lymphatiques sont petits.

1 lapin, inoculé par voie intraveineuse avec 0 milligr. 01 de cette culture, meurt après deux mois et neuf jours, porteur de lésions tuberculeuses étendues aux poumons et aux reins.

Souche B-I, 25^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye, inoculé avec 0 milligr. 01 par voie sous-cutanée, meurt d'une pneumonie après quarante jours : aucune lésion tuberculeuse, ganglions petits.

1 cobaye, inoculé avec la même dose et par la même voie, est sacrifié après quarante et un jours : il a une adénopathie caséuse inguinale et sous-lombaire pour toute lésion.

1 lapin, inoculé par voie veineuse avec 0 milligr. 01, meurt après

quarante jours d'une granulie intense, localisée aux poumons et aux reins.

Souche B-I, 29^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 lapin reçoit 1 milligramme par voie veineuse et meurt en vingt-cinq jours d'une tuberculose « Yersin » ; le bacille est isolé par ensemencement des organes de cet animal et inoculé à un deuxième lapin à la dose de 0 milligr. 1 (veine), qui meurt à son tour en vingt-quatre jours d'une tuberculose « Yersin ». L'ensemencement des organes de ce deuxième lapin sur milieu à l'œuf de Löwenstein a permis d'isoler une culture dissociée en colonies « R » et « S ». La culture « R » ainsi obtenue s'est montrée totalement avirulente pour le lapin et le cobaye à la dose de 0 milligr. 0001 (indemnes après huit mois d'observation). Par contre, 1 lapin, inoculé par voie veineuse avec 0 milligr. 0001 de la culture « S », meurt après huit mois, présentant à l'autopsie un semis de granulations caséuses sur les poumons.

1 cobaye, inoculé par voie sous-cutanée avec 0 milligr. 0001 de cette culture « S » et sacrifié huit mois et demi plus tard, ne présente aucune trace de tuberculose, mais 1 cobaye, inoculé avec la même dose de la même culture « S », meurt après sept mois, ayant une adénopathie caséuse sous-hépatique et trachéo-bronchique et une tuberculose de la rate.

Souche B-XIII, 52^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye, inoculé sous la peau avec 2 milligrammes, meurt après vingt-six jours d'une pneumococcie, sans présenter aucune lésion tuberculeuse.

1 cobaye, inoculé avec la même dose sous la peau, est sacrifié six mois plus tard ; on ne trouve chez lui aucune trace de tuberculose.

2 lapins, inoculés tous les deux par voie intraveineuse avec 2 milligrammes, meurent respectivement après quatorze et seize jours d'une tuberculose « Yersin ».

Souche B-XIII, 53^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye, ayant reçu par voie sous-cutanée 2 milligrammes de cette culture, est mort d'une maladie intercurrente le treizième jour, présentant pour toute lésion un petit abcès inguinal.

1 cobaye, inoculé avec la même dose par la même voie, vivait encore quinze mois plus tard, avec toutes les apparences d'une bonne santé.

1 lapin, inoculé par voie veineuse avec 2 milligrammes, est mort en quatorze jours d'une tuberculose « Yersin ».

Souche B-XIII, 54^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye est infecté par voie sous-cutanée avec 2 milligrammes ; il est sacrifié cinq mois plus tard et est trouvé porteur de lésions tuberculeuses en voie de généralisation.

2 lapins, injectés dans les veines avec 2 milligrammes, meurent en vingt jours d'une tuberculose « Yersin ».

Souche B-XIII, 68^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye reçoit 1 milligramme sous la peau ; il meurt après un mois d'une pneumonie : aucune lésion tuberculeuse.

1 cobaye est inoculé par la même voie avec la même dose : il est encore en parfaite santé apparente sept mois après.

2 lapins, inoculés avec 1 milligramme par voie veineuse, meurent en 19 jours d'une tuberculose « Yersin ».

Souche B-XIV, 51^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye reçoit sous la peau 2 milligrammes de cette culture ; il est sacrifié

après quatre mois, porteur d'un abcès inguinal, sans aucune autre lésion.

2 lapins, inoculés dans les veines avec 2 milligrammes, meurent respectivement en douze et dix-sept jours d'une tuberculose « Yersin ».

Souche B-XIV, 66^e passage sur pomme de terre biliée. — 1 cobaye reçoit 1 milligramme sous la peau et meurt après trente-trois jours d'une pneumococcie : il ne présente aucune lésion spécifique.

1 cobaye, infecté de même, est encore en parfaite santé apparente après sept mois.

2 lapins, infectés par voie veineuse avec 2 milligrammes, meurent respectivement en vingt-cinq et vingt-six jours d'une tuberculose « Yersin ».

Il ressort de ces exemples que les souches bovines en question, après un certain nombre de passages sur pomme de terre biliée (30 à 50), perdent leur virulence pour le cobaye, totalement ou en partie, tout en gardant provisoirement un pouvoir pathogène marqué pour le lapin. Il semble que nos souches ont en général perdu leur virulence pour le cobaye plus tardivement que le bacille bovin « lait Nocard », qui, entre les mains de A. Calmette et C. Guérin, est devenu le BCG. Pour celui-ci, il semble y avoir eu également une certaine dissociation entre la virulence pour le lapin et celle pour le cobaye, mais beaucoup moins prononcée, et les auteurs n'y insistent pas.

2. CARACTÈRE « TOXIQUE » DU POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE LAPIN CHEZ CERTAINES CULTURES BOVINES BILIÉES.

Avant de décrire les cas, où il nous a semblé que les cultures inoculées avaient fait montre d'un pouvoir « toxique » exalté pour le lapin, nous croyons bien faire, en rappelant en quelques mots quels sont les effets, chez le lapin, d'une inoculation massive intraveineuse de bacilles tuberculeux de type bovin ou aviaire. Nous avons insisté plusieurs fois sur cette différence, et pour plus de détails nous renvoyons à nos mémoires antérieurs, consacrés à ce sujet (5).

Au cours de nos recherches sur le pouvoir pathogène du bacille tuberculeux aviaire, nous avons eu, en effet, l'occasion d'étudier cette forme de tuberculose rapidement mortelle qu'on

(5) Ces *Annales*, 59, 1937, p. 182 ; 63, 1939, p. 443.

appelle la toxi-infection tuberculeuse du type Yersin, et qu'on obtient en injectant à un lapin, par la voie veineuse, une dose convenable (1 à 2 milligrammes) d'une culture aviaire pathogène. Les animaux ainsi infectés meurent entre le douzième et le vingt-huitième jour de l'infection, et à l'autopsie on est frappé par l'absence de toute lésion nodulaire, visible à l'œil nu. A l'examen histologique des reins, on constate l'absence totale des lésions folliculaires typiques, et on n'y trouve que de la dégénérescence granulaire de quelques tubes contournés et de tubes de Henle, une réaction interstitielle à polynucléaires, de la dilatation glomérulaire, avec ou sans pycnose, avec ou sans congestion, de l'ectasie vasculaire, et, rarement, de la cytolysse de tubes contournés, bref, des signes de néphrite toxique banale. Les images microscopiques des poumons sont surtout caractérisées par de la tramite : une infiltration à polynucléaires et à histiocytes de la trame ; il y a souvent de l'œdème alvéolaire, et, dans la plupart des cas, un semis de nodules épithélioïdes (quelquefois caséifiés), qui peuvent toutefois faire défaut ; il y a souvent une congestion prononcée.

On peut provoquer, chez le lapin, une toxi-infection « Yersin », évoluant cliniquement comme celle que nous venons de mentionner, en lui inoculant, par voie veineuse, non des bacilles aviaires, mais des bacilles de type bovin à dose suffisante (1 à 2 milligrammes). A l'autopsie cependant, il y a une différence : on trouve toujours une granulie pulmonaire visible à l'œil nu, même chez les lapins morts en douze jours, et l'examen des coupes histologiques révèle l'existence constante (à de rares exceptions près), dans les reins comme ailleurs, de semis de granulations caséuses.

De cette différence anatomique entre les deux formes de tuberculose « Yersin », celle causée par le bacille aviaire, et celle provoquée par le bacille bovin, ainsi que d'une série d'expériences, effectuées pour vérifier cette différence de comportement entre les deux types de bacilles tuberculeux (6), nous avons cru pouvoir déduire que le bacille aviaire est généralement doué d'une « toxicité » plus grande pour le lapin que le bacille bovin, puisque le bacille aviaire est capable de

(6) Ces *Annales*, 63, 1939, p. 443.

provoquer des lésions à caractère toxique banal, dans une mesure bien plus forte que ne le fait le bacille bovin normal.

Voyons maintenant en quoi les cultures bovines biliées que nous avons étudiées se sont distinguées des cultures bovines normales.

Pour éviter des longueurs inutiles, disons tout de suite que les 5 souches étudiées se comportaient, avant leur passage sur bile, comme des souches bovines classiques, en ce qui concerne les lésions anatomiques qu'elles causaient chez le lapin après inoculation intraveineuse d'une dose de 1 à 2 milligrammes : les animaux présentaient à l'autopsie les images de granulie pulmonaire macroscopiquement visibles et on trouvait sur les coupes de leurs reins les semis de nodules caséeux que nous venons de mentionner comme caractéristiques pour la tuberculose « Yersin » de type bovin.

En parcourant nos protocoles d'expériences, un fait se dégage d'emblée : à partir du vingt-sixième passage pour la souche H, un peu plus tardivement pour les autres cultures, l'inoculation intraveineuse de 1 à 2 milligrammes chez le lapin, tout en tuant l'animal d'une tuberculose « Yersin », ne provoque plus, dans les trois cinquièmes des cas environ, ces granulies pulmonaires, caractéristiques pour l'infection bovine. Voici, réunies en un tableau, les inoculations dont il s'agit.

« Yersin » sans granulie pulmonaire.

- 2 lapins, 1 milligramme culture H, 26^e passage, bile, morts en dix-huit et onze jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture H, 31^e passage, bile, mort en vingt-quatre jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-I, 29^e passage, bile, mort en vingt-cinq jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture porc, 36^e passage, bile, mort en vingt-quatre jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture porc, 44^e passage, bile, mort en vingt-quatre jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIII, 36^e passage, bile, mort en vingt jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIII, 42^e passage, bile, mort en vingt jours.
- 2 lapins, 1 milligramme culture B-XIII, 50^e passage, bile, morts en dix-huit et vingt-quatre jours.
- 2 lapins, 2 milligrammes culture B-XIII, 52^e passage, bile, morts en quatorze et seize jours.

- 1 lapin, 2 milligrammes culture B-XIII, 53^e passage, bile, mort en quatorze jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIV, 32^e passage, bile, mort en seize jours.
- 2 lapins, 1 milligramme culture B-XIV, 48^e passage, bile, morts en dix-neuf et vingt-quatre jours.
- 2 lapins, 2 milligrammes culture B-XIV, 51^e passage, bile, morts en douze et dix-sept jours.
- 1 lapin, 2 milligrammes culture B-XIV, 52^e passage, bile, mort en quinze jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIV, 66^e passage, bile, mort en vingt-cinq jours.

Au total : 20 lapins.

« Yersin » avec granulie pulmonaire (type bovin).

- 1 lapin, 0 milligr. 1 culture H, 26^e passage, bile, mort en vingt-cinq jours.
- 1 lapin, 0 milligr. 1 culture B-I, 29^e passage, bile, mort en vingt-quatre jours.
- 1 lapin, 0 milligr. 1 culture porc, 20^e passage, bile, mort en vingt-quatre jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIII, 42^e passage, bile, mort en vingt-neuf jours.
- 2 lapins, 2 milligrammes culture B-XIII, 54^e passage, bile, morts en vingt jours.
- 1 lapin, 2 milligrammes culture B-XIII, 55^e passage, bile, mort en dix-huit jours.
- 1 lapin, 2 milligrammes culture B-XIII, 56^e passage, bile, mort en vingt et un jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIII, 68^e passage, bile, mort en dix-neuf jours.
- 1 lapin, 1 milligramme culture B-XIV, 28^e passage, bile, mort en vingt-neuf jours.
- 2 lapins, 1 milligramme culture B-XIV, 40^e passage, bile, morts en vingt-deux jours.
- 1 lapin, 2 milligrammes culture B-XIV, 52^e passage, bile, mort en quinze jours.
- 1 lapin, 2 milligrammes culture B-XIV, 66^e passage, bile, mort en vingt-six jours.

Au total : 14 lapins.

On voit que, sur 34 lapins, inoculés par voie intraveineuse avec 0,1 à 2 milligrammes de ces souches bovines, entretenues depuis plus d'un an sur pomme de terre biliée, 20 ont succombé à une tuberculose « Yersin » sans granulie pulmonaire, c'est-à-dire ressemblant au type de tuberculose « Yersin » tel que le provoque le bacille aviaire.

Cette ressemblance n'est pas seulement macroscopique :

les exemples que nous allons produire montrent que même à l'examen histologique les images se rapprochent de celles que nous avons relevées chez des lapins morts de tuberculose « Yersin » consécutive à une infection par le bacille aviaire (7).

Lapin, inoculé le 4 mars 1939 dans les veines avec 2 milligrammes de la culture B-XIII, 52^e passage sur bile, mort le 18 mars 1939. Autopsie : aucune granulation visible sur les poumons ; foie, rate, reins et surrénales : aucune lésion spécifique ; congestion du foie et de la rate. *Examen histologique. Poumon* : tramite diffuse et placards d'alvéolite épithélioïde d'importance variable, bacilles +. *Foie* : traînées et nodules réactionnels réticulo-leucocytaires à bacilles +, sclérose et congestion des espaces conjonctifs. *Rate* : prolifération épithélioïde et plasmods morcelant la pulpe blanche, bacilles +, stase pulpe rouge. *Rein* : dilatation glomérules et tubes, quelques aspects granuleux.

Lapin, inoculé le 18 mars 1939, par voie veineuse, avec 2 milligrammes de la culture B-XIII, 53^e passage sur bile, mort le 1^{er} avril 1939. Autopsie : poumons légèrement congestionnés, sans aucune granulation ; rate légèrement tuméfiée ; foie : trame visible ; reins : aspect normal. *Examen histologique. Poumon* : infiltration histio-leucocytaire diffuse et nodules épithélioïdes en voie de nécrose, bacilles +. *Foie* : semis de nodules réticulo-leucocytaires à bacilles +. *Rate* : plages épithélioïdes nombreuses à bacilles +. *Rein* : dilatation, œdème, infiltration glomérules.

Lapin, inoculé le 29 juin 1938, par voie veineuse, avec 1 milligramme de la culture B-XIV, 32^e passage sur bile, mort le 15 juillet 1938. Autopsie : poumons vitreux ; rate tuméfiée ; foie congestionné ; reins hypertrophiés (deux fois le volume normal) ; surrénales légèrement congestionnées ; nulle part aucune granulation visible. *Examen histologique. Poumon* : de nombreuses plages d'alvéolite épithélioïde rarement caséeuses, à bacilles ++. *Foie* : dislocation des travées par infiltration leucocytaire et prolifération réticulaire abondantes, de nombreux plasmods, bacilles ++. *Rate* : presque entièrement envahie par une prolifération réticulaire de type plasmodial, bacilles ++. *Rein* : infiltration lymphocytaire des glomérules, congestion, réaction interstitielle. *Surrénale* : de nombreux amas leucocytaires interstitiels.

Lapin, inoculé le 4 février 1939, par voie veineuse, avec 1 milligramme de la culture B-XIV, 48^e passage sur bile, mort le 23 février 1939. Autopsie : poumons : pas de granulations visibles, pneumonie lobe supérieur droit ; foie : trame visible ; rate tuméfiée, 4 fois le volume normal. — *Examen histologique. Poumon* : grosses lésions exsudatives, trame et alvéoles. *Foie* : réaction diffuse réticulo-leucocytaire très marquée, bacilles +. *Rate* : œdème des cordons et prolifération épithélioïde en nappes diffuses, plasmods. *Rein* : infiltration et réaction interstitielle, dilatation et dégénérescence des tubes contournés.

(7) Voir les mémoires cités, publiés dans les *Annales de l'Institut Pasteur*. Nous remercions M. Bablet, dans le service duquel ont été faites les coupes histologiques.

Lapin, inoculé le 18 mars 1939, par voie veineuse, avec 2 milligrammes de la culture B-XIV, 51^e passage sur bile, mort le 4 avril 1939. Autopsie : poumons légèrement congestionnés, parsemés de petites pétéchies; foie : trame visible; rate tuméfiée, 4 fois le volume normal; reins et surrénales d'aspect normal. *Examen histologique*. *Poumon* : infiltration de la trame et nombreux nodules histio-leucocytaires, parfois caséux, à bacilles +. *Foie* : semis de nodules réticulo-leucocytaires. *Rate* : nappes épithélioïdes, bacilles +. *Rein* : dilatation glomérules et cylindres hématiques.

On voit combien ces descriptions se rapprochent de la brève esquisse que nous avons donnée plus haut de la tuberculose « Yersin » à bacilles aviaires. Comme pour le bacille aviaire, les lésions pulmonaires sont caractérisées surtout par une « tramite » à histiocytes et à polynucléaires et de l'alvéolite ; les nodules typiques peuvent faire défaut. Le caractère plutôt toxique de l'infection apparaît surtout sur les coupes du rein, où les tubercules caséux sont absents, et où on ne trouve que des signes de néphrite toxique banale plus ou moins prononcée. Ces dernières images sont comparables non seulement à celles qu'on trouve chez des lapins morts de tuberculose « Yersin » à bacilles aviaires, mais également à celles que présentent des lapins inoculés à plusieurs reprises avec des bacilles tuberculeux bovins morts, comme nous l'avons vu avec J. Solomidès (8).

Nous croyons pouvoir tirer de ces expériences les conclusions provisoires que voici. Le bacille tuberculeux de type bovin, au cours des réensemencements successifs sur pomme de terre biliée, tend à perdre son pouvoir tuberculigène, ce que nous avons appelé le facteur « virulent » de son pouvoir pathogène. C'est ce qui découle des inoculations, faites chez le cobaye par voie sous-cutanée, de doses souvent assez fortes, avec des survies longues et même définitives dans certains cas. Les inoculations faites en même temps chez des lapins, mais dans les veines, voie d'infection beaucoup plus sévère, montrent que ces mêmes cultures, tout en ne provoquant souvent plus de granulies apparentes ou même microscopiques, ont encore un pouvoir « toxique » très accusé, pouvoir qui les rapproche des bacilles aviaires, dont

(8) Ces *Annales*, 64, 1940, p. 73.

le pouvoir tuberculigène, « virulent », est également de beaucoup inférieur au pouvoir « toxique ». Des recherches ultérieures devront montrer à quel moment les souches bovines biliées perdront à leur tour le pouvoir « toxique » dont elles sont douées pendant une certaine période de leur atténuation, tout comme l'a été, aux débuts de ses très nombreux passages sur la pomme de terre biliée, la culture « lait Nocard », qui est devenue le bacille parfaitement inoffensif qu'est le BCG actuel.

**DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE
DES SÉRUMS ANTI-*PERFRINGENS* A,
ANTI-VIBRION SEPTIQUE, ANTI-HISTOLYTIQUE
ET ANTI-ŒDEMATIENS
PRÉPARATION, TITRAGE ET PROPRIÉTÉS
DES TOXINES CORRESPONDANTES**

(PREMIER MÉMOIRE)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TOXINE DU BAC. *PERFRINGENS* A *

par MAYLIS GUILLAUMIE (1).

SOMMAIRE

Introduction.

Titrage de la toxine *perfringens* A et de l'antitoxine correspondante.

- I. TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-*perfringens* A VIS-A-VIS DE DIVERS ÉCHANTILLONS DE TOXINE *perfringens* A D'ORIGINES DIFFÉRENTES.
- II. TITRE DE LA TOXINE *perfringens* A ÉLABORÉE DANS LE BOUILLON Vf PAR LA SOUCHE LECHIEU (titrages par la méthode des injections intraveineuses à la souris).
 - A. Semence employée.
 - B. Titre de la toxine *perfringens* liquide.
 - C. Toxine *perfringens* précipitée par le sulfate d'ammonium.
 - a) Dose minima mortelle.
 - b) « Dose-test » déterminée comparativement avec deux sérums étalons. Observations relatives à l'âge et au pH des bouillons.

Propriétés de la toxine *perfringens* A. Toxinogénèse dans différents milieux.

- I. ACTION HÉMOLYTIQUE DE LA TOXINE *perfringens* (titrages *in vitro*).
 - A. Toxine liquide.
 - a) Dose minima hémolytique de la toxine préparée dans du bouillon Vf.

* Synonymes de *Bacillus perfringens* : *B. welchii* ; *Clostridium welchii* ; *Welchia perfringens*.

(1) Pendant la maladie qui devait l'emporter, M. Weinberg m'a

- b) Dose minima hémolytique de la toxine préparée dans du bouillon Vf additionné de différentes peptones.
- c) Dose minima hémolytique de la toxine préparée dans du bouillon Vf additionné de cystéine.

B. *Toxine précipitée par le sulfate d'ammonium.*

- a) Dose minima hémolytique.
- b) Titre hémolytique déterminé avec un sérum étalon.
 - 1° Technique.
 - 2° Résultats des titrages effectués avec le sérum étalon danois.
 - 3° Résultats des titrages effectués comparativement avec les sérums étalons danois et français.
- c) Titre anti-hémolytique des sérums anti-*perfringens*.

II. ACTION GÉLATINOLYTIQUE DE LA TOXINE *perfringens* PRÉCIPITÉE.

III. ESSAIS DE PRÉPARATION DE LA TOXINE *perfringens* DANS DES MILIEUX SYNTHÉTIQUES.

IV. RECHERCHES POUR AUGMENTER LA PRODUCTION DE LA TOXINE *perfringens* DANS LE BOUILLON Vf.

A. *Toxinogénèse en présence de pyruvate de soude et de phosphate bipotassique.*

Vitesse de formation de la toxine *perfringens*, à différentes températures, dans des bouillons Vf de valeur nutritive inégale.

B. *Toxinogénèse en présence d'acide ascorbique (vitamine C).*

C. *Toxinogénèse dans le bouillon Vf additionné de peptones commerciales.*

Préparation du bouillon Vf.

Résumé et conclusions.

Henry (2) a suggéré, en 1922, de déterminer *in vitro* l'action anti-hémolytique des sérums anti-*perfringens* A pour apprécier leur pouvoir antitoxique. Mason et Glenny (3),

demandé d'exposer les résultats des recherches que je poursuivais dans son Laboratoire sur le titrage et la préparation des toxines gangréneuses et des immunsérums correspondants.

Longtemps différé par les événements, le mémoire actuel constitue la première partie d'un travail que je continue actuellement.

(2) HENRY (H.). *J. Path. a. Bact.*, **22**, 1922, p. 1.

(3) MASON (J. H.) et GLENNY (A. T.). *J. Path. a. Bact.*, **31**, 1928, p. 628 à 632.

puis Dalling, Glenny, Mason et O'Brien (4), Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling et Ross (5), ont appliqué ce procédé et recherché parallèlement, par la méthode des injections intraveineuses à la souris, le titre antitoxique des sérums anti-*perfringens* A. Ils ont conclu que les résultats des déterminations *in vitro* concordent avec ceux des expériences *in vivo*. D'après Dalling et Mason, il existe aussi une concordance entre les valeurs antitoxiques et anti-hémolytiques des sérums anti-*perfringens* B.

Au cours de nos recherches sur les antigènes de l'espèce *perfringens* (6), nous avons établi que le titre anti-hémolytique d'un sérum anti-*perfringens* C peut varier du simple au double et même davantage, suivant l'échantillon d'hémolytine homologue employé dans le titrage (7). Ce fait surprenant nous a incités à consacrer quelque temps à l'étude de l'évaluation du titre des sérums anti-*perfringens* A, C et D.

Dès nos premiers contrôles, nous avons constaté, d'une part, que l'on peut obtenir des titres antitoxiques très différents pour un même sérum lorsqu'on effectue le dosage avec des toxines homologues préparées avec la même souche microbienne, mais à des dates variées (8), et, d'autre part, qu'il n'existe pas toujours de parallélisme entre le pouvoir antitoxique et l'action anti-hémolytique de deux sérums anti-*perfringens* A éprouvés vis-à-vis de quatre échantillons de toxine *perfringens* (9), de sorte que les résultats des déterminations *in vitro* du titre anti-hémolytique ne peuvent,

(4) DALLING (T.), GLENNY (A. T.), MASON (J. H.) et O'BRIEN (R. A.). *British Journ. exper. path.*, **9**, 1928, p. 43 à 48.

(5) GLENNY (A. T.), BARR (M.), LLEWELLYN-JONES (M.), DALLING (T.) et ROSS (H.). *Journ. Path. a. Bact.*, **37**, 1933, p. 53.

(6) Rappelons les synonymes suivants : *Bac. perfringens* B = *Bacillus* L. D. (*Lamb dysentery bacillus*) ; *Bacillus agni* ; *Welchia agni*. — *Bac. perfringens* C = *Bacillus paludis* ; *Welchia agni* (variété *paludis*). — *Bac. perfringens* D = *Bacillus D* de Wildson ; *Welchia agni* (sous-variété *Wildsoni*).

(7) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *Revue d'Immunologie*, **2**, 1936, p. 513 à 540.

(8) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. de Biol.*, **123**, 14 novembre 1936, p. 661 ; *Ibid.*, **126**, 1937, p. 656 ; *Ibid.*, **127**, 1938, p. 1084.

(9) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Acad. des Sc.*, **204**, 1937, p. 1012.

d'après nous, renseigner en toute certitude sur la valeur antitoxique des sérums anti-*perfringens* (10).

Ces données nouvelles mettaient en lumière non seulement l'insuffisance des méthodes habituelles de titrage des sérums anti-*perfringens*, mais encore la variabilité de constitution des toxines correspondantes et, par voie de conséquence, faisaient entrevoir la complexité du problème du titrage des toxines *perfringens* et des sérums anti-*perfringens*.

Jugeant que des questions d'une telle importance devaient être soumises sans retard à un examen approfondi, nous avons titré les nombreux échantillons de toxine *perfringens* A que nous possédions (11) et recherché le titre antitoxique de quelques sérums vis-à-vis de ces échantillons (12).

Pour titrer nos échantillons de toxine *perfringens* A, nous avons préparé trois sérums étalons anti-*perfringens* A dont le pouvoir antitoxique vis-à-vis de plusieurs de ces échantillons de toxine était identique à celui du sérum étalon international titré en Angleterre (13). L'unité antitoxique de nos sérums étalons neutralisait, en effet, le même poids de l'échantillon de toxine considéré que l'unité antitoxique internationale du sérum étalon anglais. Après nous être ainsi bien assurés que nos sérums étalons étaient équivalents au sérum anglais vis-à-vis d'un échantillon de toxine, nous les avons

(10) IPSEN (J.) nous a communiqué, au mois de mai 1939, des résultats qui confirment cette conclusion.

(11) Tous ces échantillons de toxine ont été obtenus par le même procédé, mais dans des bouillons Vf préparés à des dates différentes : du bouillon Vf, ajusté à pH 7.7-7.8, réparti en flacons de 5 litres et glucosé à 1 p. 1.000, est stérilisé, puis ensemencé avec une culture de six à dix-huit heures de B. *perfringens* souche Lechien. (Cette culture est effectuée dans du bouillon identique à celui des flacons à ensemencer.) Au bout de vingt-deux heures d'étuve à 35-36°, les cultures sont centrifugées. Le liquide clair de centrifugation est additionné de sulfate neutre d'ammonium pur ; la toxine précipitée est essorée, puis desséchée dans une cloche à vide et, après pulvérisation, répartie en ampoules scellées sous le vide.

(12) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *Bull. trim. de l'Org. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, 7, 1938, p. 883 ; *Bull. trim. de l'Acad. de Méd.*, 124, 1939, p. 20 ; *Rev. d'Immunologie*, 5, 1939, p. 5.

(13) L'Institut National des Recherches médicales de Hampstead et le Laboratoire de Standardisation biologique de Copenhague ont assumé jusqu'à présent la charge de préparer le sérum étalon international et de le distribuer aux divers Instituts qui en désirent.

indifféremment utilisées pour titrer nos diverses préparations de toxine *perfringens* A, c'est-à-dire pour déterminer la « dose-test » de chacune d'elles (14). Puis, pour contrôler quelques-unes de ces déterminations, nous avons employé le sérum étalon anglais, à la place d'un sérum étalon français. En raison des divergences que nous avons alors souvent observées entre les résultats des titrages pratiqués avec ces deux sérums étalons, nous avons ensuite systématiquement effectué les déterminations de la « dose-test » de tous nos échantillons de toxine *perfringens* A, comparativement, avec les sérums étalons international et français. Cette étude nous a amenée à constater que l'unité antitoxique d'un sérum étalon français — dont le pouvoir antitoxique vis-à-vis d'un échantillon donné de toxine est égal à celui du sérum étalon international — ne neutralise pas toujours le même poids de toxine *perfringens* A que l'unité antitoxique du sérum étalon international. En voici un exemple : l'unité antitoxique du sérum français St 3 neutralise 1 milligr. 1 de l'échantillon de toxine E 19 ; l'unité antitoxique du sérum étalon anglais neutralise 2 milligr. 6 de cette toxine et, cependant, ces deux sérums sont identiques vis-à-vis de l'échantillon E 15 : une unité antitoxique de l'un ou de l'autre neutralise 1 milligr. 45 de cet échantillon. Ainsi, d'après ces dosages, la valeur de la « dose-test » de la toxine E 19 est de 1 milligr. 1 ou de 2 milligr. 6, suivant que le titrage est fait avec le sérum étalon français ou avec le sérum étalon anglais. Ces résultats, extraits parmi d'autres semblables de nos expériences sur le titrage des toxines *perfringens* A, montrent que, *suivant les sérums étalons anti-perfringens A utilisés pour déterminer la valeur de la « dose-test » d'un même échantillon de toxine perfringens A, les chiffres trouvés peuvent différer de plus de 100 p. 100* (15).

(14) Dans toutes nos recherches, la « dose-test » d'un échantillon de toxine *perfringens* A est le poids de toxine qui, après une heure de contact à 37° avec une unité antitoxique d'un sérum étalon, ne tue environ que la moitié des souris de 17 à 20 grammes auxquelles un tel mélange est injecté ; le volume du mélange de toxine et de sérum injecté à chaque souris dans une des veines caudales est de 0 c. c. 5.

(15) Nous désignerons par « dose-test internationale » d'un échan-

*
* *

Dans une autre série d'expériences, nous avons recherché, vis-à-vis de plusieurs des échantillons de toxine que nous venions de titrer, la valeur antitoxique de différents sérums thérapeutiques anti-*perfringens* A ; comme dose d'épreuve de chaque toxine nous avons employé soit une « dose-test internationale », soit une « dose-test française », soit encore une « unité » de toxine (c'est-à-dire 20 D. M. M. de l'échantillon considéré). Nos résultats ont montré que, quelle que soit la dose de toxine utilisée dans les titrages, *la détermination du titre antitoxique d'un sérum anti-perfringens A, effectuée comparativement avec divers échantillons de toxine perfringens A, fournit souvent des résultats extrêmement divergents*. Voici les chiffres notés au cours d'un titrage pratiqué avec une « dose-test anglaise » de 9 échantillons de toxine : le sérum 445 titre 700 unités d'après les dosages faits avec la toxine E 16 ; 450 unités d'après ceux réalisés avec les toxines E 4, E 5, E 14 ou E 22 ; 400 unités vis-à-vis de la toxine E 13 ou vis-à-vis de la toxine E 18 ; 50 à 60 unités lorsque le titrage est réalisé avec une « dose-test anglaise » des toxines E 24, E 26.

Ce fait nouveau, en opposition formelle avec la notion formulée en 1931 par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations et admise jusqu'à présent, a suscité de nombreux contrôles ; pour l'illustrer suffisamment, nous indiquerons plus loin (p. 218 et 219) quelques-unes des discordances que nous avons encore notées et aussi un certain nombre de vérifications effectuées dans d'autres pays, vérifications qui confirment pleinement nos observations.

*
* *

L'examen critique de l'ensemble de nos résultats sur le titrage *in vivo* des toxines *perfringens* A et des immunsérums correspondants, nous a amenée à conclure que les sérums

tillon de toxine *perfringens*, la valeur déterminée avec le sérum étalon international, c'est-à-dire le poids de toxine qui est neutralisé, dans les conditions précédemment indiquées, par une unité antitoxique du sérum international, et par « dose-test française » le poids de toxine que neutralise une unité antitoxique du sérum étalon français.

étalons, d'une part, et la toxine *perfringens*, d'autre part, peuvent présenter d'un échantillon à l'autre de telles différences de constitution que le principe du titrage des sérums anti-*perfringens* A tel qu'il est appliqué depuis 1931 (16) doit être modifié. D'après nous, il faudrait, pour comparer la valeur antitoxique globale des sérums préparés dans différents Instituts, utiliser le même échantillon de toxine dont la « dose-test » serait déterminée avec le sérum étalon international : il conviendrait aussi de spécifier la richesse des sérums en anticorps vis-à-vis de chacun des antigènes essentiels (17) de la toxine standard. Il serait nécessaire également de procéder au titrage de nos échantillons de toxine *perfringens* par la méthode rapide de la floculation décrite par M. Ramon (18), puis de déterminer, par la même méthode, le titre des sérums anti-*perfringens* afin de comparer les résultats ainsi obtenus avec ceux des titrages *in vivo*.

Les difficultés inattendues que nous avons rencontrées en titrant les sérums anti-*perfringens*, difficultés que d'autres expérimentateurs observent à présent (19), nous ont engagée à rechercher le degré de précision que fournissent les déterminations du titre antitoxique d'un même sérum anti-Vibron septique effectuées avec divers échantillons de toxine Vibron septique et celles de la « dose-test » d'un échantillon de toxine Vibron septique titré avec différents sérums étalons.

Avant d'aborder cette étude, nous avons procédé à l'analyse détaillée des travaux ayant trait à la neutralisation des toxines Vibron septique titré par les immunosérums correspondants.

Ficker (20) a signalé que le sérum d'un cheval immunisé avec une souche de Vibron septique neutralise non seulement

(16) Rapport de HARTLEY (P.). *Bull. trim. de l'Organ. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, Londres, 23 juin 1931, p. 13 à 27. — Voir aussi l'article de BENGSTON (Ida A.). *Public Health Reports*, 49, 1934, p. 525.

(17) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *C. R. Acad. des Sc.*, 204, 1937, p. 1012.

(18) RAMON (G.). *Revue d'Immunologie*, 6, 1940, p. 65 à 85.

(19) Des différences de 78 à 129 p. 100 ont été observées récemment par LLEWELLYN-SMITH, SORDELLI et IPSEN au cours du titrage de 3 sérums anti-*perfringens* avec 3 échantillons de toxine correspondante. IPSEN a constaté des divergences encore plus considérables en utilisant 4 autres échantillons de toxine *perfringens*.

(20) FICKER (M.). *Medizin. Klinik*, 43, 1917, p. 1181.

la toxine produite par cette souche, mais aussi celles qui sont élaborées par trois autres ; toutefois, il n'a pas systématiquement effectué des expériences quantitatives de neutralisation en vue de préciser la valeur antitoxique du sérum examiné vis-à-vis de chacune des différentes toxines étudiées.

M. Robertson (21) a beaucoup insisté sur le fait que la toxine produite par 11 souches de *Vibrio* septique, appartenant aux types sérologiques I, II et III, est neutralisée par deux sérums anti-*Vibrio* septique provenant d'animaux immunisés, l'un avec une souche du type I, l'autre avec une souche du type III ; mais cet auteur, de même que le précédent, n'a pas effectué ses recherches au point de vue quantitatif que nous envisageons ici, bien que l'intérêt d'une telle étude ne lui ait pas échappé : dans son travail, on ne trouve ni le titre précis des toxines examinées, ni la valeur antitoxique du même sérum vis-à-vis de plusieurs échantillons de toxine homologue. Ce problème n'a été envisagé ni par Davesne (22) au cours de ses études sur les groupes sérologiques du *Vibrio* septique, ni par Weinberg et ses collaborateurs (23) lorsqu'ils ont longuement comparé les propriétés des sérums anti-*Vibrio* septique et anti-Chauvcei, ni par Tzekhnovitzer et Karouth (24) pendant leurs recherches sur le titrage des sérums anti-*Vibrio* septique par le procédé des injections intradermiques au Cobaye.

Les premiers auteurs (Sordelli, Ferrari et Mayer, 1929 ; Glenny, Llewellyn-Jones et Mason, 1931 ; Schlingmann, 1931), qui ont préparé un sérum étalon provisoire pour déterminer la « dose-test » de l'échantillon de toxine *Vibrio* septique qui doit servir à l'évaluation du titre antitoxique des sérums thérapeutiques, n'ont pas indiqué, vis-à-vis de plusieurs échantillons de toxine, le titre antitoxique d'un même sérum (25). Les travaux ultérieurs de Weinberg, Davesne et

(21) ROBERTSON (Muriel). *Journ. Path. and Bact.*, **23**, 1919, p. 153.

(22) DAVESNE (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 763.

(23) WEINBERG (M.) et MIHAILESCO (M.). *Ces Annales*, **43**, 1919, p. 1408.

— WEINBERG (M.) et DAVESNE (J.). *C. R. Acad. des Sc.*, **200**, 1935, p. 1074.

(24) TZEKHNOVITZER (M.) et KAROUTH (T.). *C. R. Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 1094.

(25) SORDELLI (A.), FERRARI (A.) et MAYER (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **100**, 1929, p. 150. — GLENNY (A. T.), LLEWELLYN-JONES (Mona) et MASON (J. H.). *Journ. Path. and Bact.*, **34**, 1931, p. 301. — SCHLINGMANN (A. S.). *Journ. Lab. and Clin. med.*, **16**, 1931, p. 967.

Prévot (26) et de I. Bengston (27) n'ont pas encore apporté de documents relatifs à cette question.

En 1933, le Comité d'Hygiène de la Société des Nations qui avait défini l'unité antitoxique d'un sérum étalon anti-Vibron septique (28), constatait les faits suivants en examinant les chiffres trouvés dans différents pays par les experts chargés de titrer un même sérum anti-Vibron septique (29) avec une « dose-test » de deux préparations desséchées de toxine provenant d'Hampstead, V S 10 et V S 11 :

1° Dans deux laboratoires différents (Laboratoires de M. Pétrie et de M. Weinberg) les résultats des titrages réalisés avec une « dose-test » de la toxine V S 11 confirment les résultats obtenus avec la toxine V S 10 (titrages sur souris, voie veineuse).

2° Les déterminations effectuées par M. Coy avec la toxine V S 1 préparée à Francfort, par M. O'Brien avec la toxine E récoltée dans les laboratoires Wellcome, concordent avec les résultats des dosages réalisés parallèlement avec la toxine V S 10.

De ces observations, portant sur l'examen de 4 toxines, est-il permis de déduire que les titrages, pratiqués avec plusieurs autres échantillons de toxine, donneront sûrement des résultats aussi satisfaisants? Nous ne saurions le faire, étant donné qu'une généralisation du même ordre s'est avérée bien imprudente dans le cas des sérums anti-*perfringens* ; d'autre part, nous savons également que si I. Bengston (30) considère la méthode des injections intraveineuses à la souris comme

(26) WEINBERG (M.), DAVESNE (J.) et PRÉVOT (A.-R.). Ces *Annales*, 49, 1932, p. 251.

(27) BENGSTON (Ida A.). *Journ. Bact.*, 25, 1933, p. 84 ; *Public Health Rep.*, 49, 1934, p. 251. Sans chiffrer ses résultats, l'auteur signale seulement que la toxine de 66 souches de Vibron septique est neutralisable par la même antitoxine.

(28) L'unité antitoxique conventionnellement choisie est contenue dans 0 milligr. 2377 d'un sérum anti-Vibron septique (récolté et desséché à l'Institut Pasteur de Paris), titré après une nouvelle dessiccation à Hampstead, où il est conservé à —4° en ampoules scellées contenant de l'azote pur.

(29) Rapport de HARTLEY (P.) et WHITE (P. Bruce). *Bull. Org. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, 4, 1935, p. 13.

(30) BENGSTON (Ida). *Public Health Rep.*, 49, 1934, p. 257.

la méthode de choix pour le titrage des sérums anti-Vibrion septique, Sordelli, Ferrari et Mayer (31) pensent au contraire que les résultats des titrages sur souris sont moins réguliers que sur cobayes et, plus récemment, O'Brien (32) a soulevé aussi un doute sur la précision des titrages des sérums anti-Vibrion septique par voie intraveineuse à la souris. Aussi, avons-nous jugé nécessaire de reprendre l'étude du titrage des sérums anti-Vibrion septique, étude relativement facile pour nous, car nous disposons de 7 échantillons de toxine Vibrion septique préparés à des dates différentes. Nous avons d'abord déterminé la « dose-test » de chacun de ces échantillons en utilisant pour cela deux sérums standards afin de rechercher si la valeur de la « dose-test » est indépendante du sérum étalon employé pour le titrage, puis nous avons évalué le titre antitoxique des sérums thérapeutiques vis-à-vis de nos 7 échantillons de toxine. Nous avons communiqué quelques-uns de ces résultats à la Société de Biologie (33).

*
* *

La bibliographie concernant le titrage des sérums anti-histolytiques (34) montre que cette question a beaucoup plus retenu l'attention des expérimentateurs que celle de la détermination du titre antitoxique des sérums anti-*perfringens* et anti-Vibrion septique : White a constaté que les résultats du titrage d'un sérum anti-histolytique sont les mêmes que le titrage soit fait avec une « dose-test » de la toxine A 34 ou avec une « dose-test » de la toxine S 1934. Pour titrer ce même sérum O'Brien a employé la toxine 2 ou la toxine A 34 ; Pétrie a utilisé les toxines A 34 et Sordelli 1928 ; Glotova et Ostrovskaya les toxines A 34 et M 2. Tous ces auteurs ont attribué au sérum considéré la valeur antitoxique indiquée par White. Ainsi les titrages réalisés avec 3 toxines histolytiques

(31) *Loc. cit.*

(32) Cité dans le rapport de HARTLEY (P.) et WHITE (P. Bruce). *Bull. trim. de l'Org. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, 4, 1935, p. 13.

(33) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, 127, 1938, p. 1084.

(34) Voir le rapport de JENSEN (Claus). *Bull. trim. de l'Org. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, novembre 1936, p. 720.

différentes (A 34, S 1934, 2, Sordelli 1928, M 2) ont permis d'enregistrer les mêmes résultats. Avant de tirer une déduction de ce fait, reportons-nous aux résultats des titrages des sérums anti-*perfringens* A. Nous voyons, d'une part, que les chiffres trouvés au cours de la recherche du titre antitoxique du sérum 415 sont du même ordre de grandeur lorsque le titrage est fait avec l'un des 8 échantillons suivants de toxine (E 1, E 4, E 5, E 14, E 22, E 35, E 28, E 32), mais qu'ils diffèrent entre eux de deux à dix fois lorsque les titrages sont réalisés avec les toxines E 16, E 33, E 26, ou encore avec les toxines E 37, E 34, E 24 (voir tableau I, p. 218). Nous avons constaté, d'autre part, que le titre antitoxique du sérum anti-*perfringens* 135 n'est pas le même vis-à-vis des échantillons de toxines E 28, E 32, ceci montre que la concordance des résultats obtenus au cours du titrage d'un seul sérum antihistolytique avec 3 échantillons seulement de toxine histolytique n'autorise pas à conclure d'une manière définitive que le titre antitoxique des sérums anti-histolytique est indépendant de l'échantillon de toxine employé au cours du titrage. Cependant, Walbum et Reymann, en titrant 5 sérums avec la « dose-test internationale » de 3 échantillons de toxine histolytique préparés au Danemark, en France et en Allemagne, ont noté des résultats concordants, de sorte qu'il semble que le titre antitoxique d'un sérum anti-histolytique puisse être correctement déterminé avec différents échantillons de toxine histolytique (35). Pour établir avec certitude le bien-fondé de cette présomption, nous avons examiné 7 nouveaux échantillons de toxine histolytique préparés en ensemençant la même souche de B. histolytique dans des bouillons Vf glucosés ou non.

Des déterminations comparatives de la « dose-test » de différents échantillons de toxine histolytique avec le sérum étalon international et avec différents sérums étalons nationaux n'ayant pas encore été systématiquement effectuées, nous avons réalisé un certain nombre de titrages pour comparer les valeurs des « doses-test » établies soit avec le sérum international, soit avec le sérum étalon français.

(35) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, 127, 1938, p. 1084.

*
* *

Poursuivant cette étude du titrage des sérums antigangréneux, nous avons abordé celle du titrage des sérums anti-*œdematiens*.

Weinberg et Seguin (36) ont évalué dès 1917 le pouvoir antitoxique de ces sérums en injectant à des souris, sous la peau, le mélange de sérum et de toxine *œdematiens*. (La quantité de toxine utilisée était de 100 doses minima mortelles par souris.) Au cours de nombreux titrages effectués à plusieurs mois d'intervalle avec la « dose-test » d'un échantillon donné de toxine nous avons obtenu, pour un même sérum, des titres antitoxiques qui différaient au plus de 15 p. 100, en appliquant ce procédé des injections sous-cutanées à la souris. La méthode des injections intramusculaires à la souris, proposée en 1935 par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations (37), pour déterminer soit la « dose-test » de la toxine *œdematiens*, soit le titre antitoxique d'un sérum anti-*œdematiens* n'ayant pas été jugée satisfaisante par H. M. Glotova (38) qui a préféré recourir à celle des injections intraveineuses à la souris, déjà préconisée par Borthwick (39), nous n'avons pas cru devoir l'adopter ; nous avons seulement comparé le degré de précision des titrages effectués par voies sous-cutanée et intraveineuse (40). Nous avons recherché le titre antitoxique des sérums vis-à-vis d'une « dose-test » de 9 échantillons de toxine que nous avons précipités à des dates différentes ; 4 de ces échantillons ont été préparés avec une souche de *B. œdematiens* subissant depuis des années deux passages mensuels sur cobayes, les 5 autres avec une souche n'ayant subi aucun repiquage depuis 1917. Au cours de ces titrages, nous avons

(36) WEINBERG (M.) et SEGUIN (P.). *C. R. Acad. des Sc.*, **164**, 1917, p. 365.

(37) Rapport de WALBUM (L. E.) et REYMANN (C.). *Bull. trim. Org. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, **4**, 1935, p. 42.

(38) GLOTOVA (H. M.). *Ces Annales*, **59**, 1937, p. 526.

(39) BORTHWICK (VON GRIZEL R.). *Zeitsch. f. Immunitätsforsch.*, **87**, 1936, p. 389.

(40) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **127**, 1938, p. 1085.

employé comme valeur de la « dose-test » de chacun des échantillons le chiffre déterminé avec le sérum étalon français parce qu'il représente, ainsi que nous le spécifierons ultérieurement, un poids de toxine inférieur à celui qui indique la valeur de la « dose-test » établie avec le sérum étalon international (41).

*
* *

Au cours de différents articles, nous préciserons non seulement nos résultats concernant le titrage des toxines gangréneuses et la détermination du *titre antitoxique* global des sérums antigangréneux vis-à-vis de différents échantillons de chacune des toxines correspondantes, mais encore les divers essais que nous avons effectués pour améliorer la production des toxines dans le bouillon Vf. Nous indiquerons finalement, en un tableau récapitulatif, les doses de sérum étalon qui sont habituellement employées dans les différents pays pour déterminer la « dose-test » d'un échantillon de toxine et les dilutions que nous préparons pour titrer un sérum ; nous signalerons aussi la voie d'injection que nous adoptons au cours de ces titrages que nous exécutons tous suivant le même principe (42).

(41) L'unité antitoxique internationale est contenue dans 0 milligr. 2681 d'un sérum sec anti-*œdémateux* conservé à Copenhague ou dans 0 milligr. 3440 d'un sérum sec américain.

42 Nous avons utilisé un procédé uniforme pour déterminer la « dose-test » d'un échantillon de toxine — que ce soit un échantillon de toxine *perfringens*, *Vibron* septique, histolytique ou *œdémateux*. Nous avons adopté celui que le Comité d'Hygiène a proposé pour titrer les toxines *Vibron* septique et histolytique : il consiste à rechercher le poids de toxine qui, mélangé à une unité antitoxique du sérum étalon homologue, tue la moitié environ des souris injectées. Nous avons appliqué ce procédé à la toxine *perfringens* parce que la « dose-test » de nos échantillons se présente sous un poids faible.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TOXINE DU B. *PERFRINGENS* A

Titre antitoxique des sérums anti-*perfringens* A ; Titre et propriétés de la toxine *perfringens* A.

I. — TITRE ANTITOXIQUE DE 5 SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS VIS-A-VIS DE DIVERS ÉCHANTILLONS DE TOXINE PERFRINGENS D'ORIGINES DIFFÉRENTES.

Pour donner une idée des divergences inouïes que l'on peut observer au cours de la détermination du titre antitoxique des sérums anti-*perfringens* A effectuée avec une « dose-test » de différents échantillons de toxine homologue, nous avons groupé dans le tableau I quelques-uns des résultats obtenus dans différents pays. Rappelons que toutes nos déterminations sont faites en prenant comme valeur de la « dose-test » de chaque échantillon de toxine la valeur établie avec le sérum étalon international et que nos divers échantillons sont préparés avec la même souche de *B. perfringens* A.

Les chiffres du tableau I montrent que le sérum 415 titre, d'après nos déterminations, 700, 450, 400, 350, 200 à 250 ou 50 à 60 unités antitoxiques suivant l'échantillon de toxine que nous avons utilisé ; il titre d'après les résultats trouvés à Copenhague : 500, 36 ou 25 unités et, d'après le titrage réalisé en Angleterre, 35 unités. Les écarts considérables entre ces chiffres, en révélant l'insuffisance des résultats fournis par la méthode actuelle de titrage des sérums anti-*perfringens*, font ressortir l'extrême variabilité de constitution des toxines *perfringens* préparées à partir des bouillons de viande et la répercussion de cette variabilité sur les résultats des titrages effectués sur souris.

Dans le tableau II nous indiquons les résultats que nous avons obtenus en déterminant le titre antitoxique de 3 sérums anti-*perfringens* vis-à-vis de nombreux échantillons de toxine préparés dans des bouillons V¹ différents ou dans des volumes

TABLEAU I. — Titre antitoxique de cinq sérums anti-*perfringens* A déterminé avec différents échantillons de toxine *perfringens* A d'origines diverses.

SÉRUMS anti- <i>perfringens</i>	TITRE antitoxique	TOXINE <i>perfringens</i> EMPLOYÉE		TITRAGES EFFECTUÉS
		Echantillon	Origine	
Sérum 25.017 (de Paris).	200 50	E ₁ B ₃₅	Institut Pasteur, Paris. Copenhague.	Paris (Institut Pasteur) Afrique équatoriale.
Sérum (de Copenhague).	200 50	B ₃₅ E ₁	Copenhague. Institut Pasteur, Paris.	Afrique équatoriale. Paris (Institut Pasteur)
Sérum 425 (de Vienne).	400	E ₂₇	Institut Pasteur, Paris.	Copenhague.
	80	Penx 18	Beckenham.	Copenhague.
	63	Prg 590	Francfort	Copenhague.
	63 50	B ₃₅	Copenhague.	Copenhague. Vienne.
	700	E ₁₆	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	450	E ₁₁ , E ₂₈ , E ₁₄₁ , E ₂₂ , E ₃₅	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	400-450	E ₁ , E ₂₈	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	400	E ₁₃ , E ₁₈ , E ₃₂	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	350	E ₃₃	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	200-250	E ₃₄	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
Sérum 415 (de Paris).	50	E ₂₄	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	50-60	E ₂₆	Institut Pasteur, Paris.	Paris (Institut Pasteur)
	500	E ₂₇	Institut Pasteur, Paris.	Copenhague.
	36	Penx 18 et B ₃₅		Copenhague.
	25	Prg 590	Francfort.	Copenhague.
	35		Angleterre.	Angleterre.
Sérum VII (de Copenhague).	720	E ₂₇	Institut Pasteur, Paris.	Copenhague.
	333	Prg 590	Francfort.	Copenhague.
	275	B ₃₅	Copenhague.	Copenhague.
	250	Penx 18	Beckenham.	Copenhague.

égaux du même bouillon, ensemencés avec notre souche habituelle de *B. perfringens* type A. Ainsi, le bouillon du 7 septembre a servi à préparer les toxines E 31, E 32, E 33, E 34 et celui du 6 octobre les toxines E 36, E 37.

Pour mettre en relief quelques exemples frappants des différences de constitution qui existent, d'une part, entre divers échantillons de toxine *perfringens* et, d'autre part, entre quelques sérums anti-*perfringens*, nous rapprocherons les chiffres suivants du tableau II :

Le sérum 415 titre 400 à 500 unités anti-E 28 et anti-E 32. 200 à 250 unités anti-E 34, 250 à 300 unités anti-E 42 ; ces

TABLEAU II. — Titre antitoxique de trois sérums anti-*perfringens* A vis-à-vis de divers échantillons de toxine homologue obtenus à des dates variées dans le même bouillon Vf ou dans des bouillons Vf différents, ensemencés avec la même souche de *B. perfringens* A.

BOUILLON Vf		ÉCHANTILLON DE TOXINE		TITRE ANTITOXIQUE de trois sérums anti- <i>perfringens</i>		
Date de la préparation	Date de l'ensemencement	Numéro et dose minima mortelle	Dose-test	Sérum 135	Sérum 415	Sérum 714
		(milligr.)	(milligr.)	(unités)	(unités)	(unités)
7 mai 1937.	13 mai 1937.	E ₁₄ (0,08)	1,8		450	350
10 fév. 1939.	20 fév. 1939.	E ₂₈ (0,08)	1,7	100-125	400-450	250-300
7 sept. 1939.	13 sept. 1939.	E ₃₁ (0,045)	1,2	150-175	350-400	300-350
	15 sept. 1939.	E ₃₂ (0,08)	1,1	40-50	400	250
	21 sept. 1939.	E ₃₃ (0,045)	1,3	125	350	200-250
	26 sept. 1939.	E ₃₄ (0,035)	1,05	100-125	200-250	125-150
22 sept. 1939.	28 sept. 1939.	E ₃₈ (0,075)	1,3	100	450	300
6 oct. 1939.	12 oct. 1939.	E ₃₆ (0,055)	1,6	150-200	350-400	350
	18 oct. 1939.	E ₃₇ (0,07)	2,6	100-125	450-500	300-350
16 nov. 1939.	22 nov. 1939.	E ₃₉ (0,085)	2,15	100	550	450-500
	29 nov. 1939.	E ₄₁ (0,065)	1,9	100	550	450
	29 nov. 1939.	P ₂₈ (0,13)	2,9	100-125	500	350-400
24 nov. 1939.	6 déc. 1939.	P ₂₉ (0,13)	3,2	150	400	350-400
	7 déc. 1939.	E ₄₃ (0,065)	2,55	100	250-300	250-300

résultats indiquent que les toxines E 32 et E 34 provenant du même bouillon ont des compositions différentes.

Le sérum 135 (saignée du 21 juillet 1936) titre 100 unités anti-E 42, 100 à 125 unités anti-E 28 et anti-E 34 et, seulement, 40 à 50 unités anti-E 32.

Le sérum 714 (saignée du 9 décembre 1938) titre 250 unités anti-E 32, 250 à 300 unités anti-E 28 et anti-E 42 et seulement 125 à 150 unités anti-E 34.

Ces résultats montrent que le sérum 415 neutralise aussi bien la toxine E 28 que la toxine E 32 et nettement moins bien les toxines E 34 et E 42 ; le sérum 135, par contre, neutralise beaucoup moins bien la toxine E 32 que la toxine E 28 et neutralise à un degré voisin les toxines E 28, E 34, E 42 : le sérum 714 neutralise à des taux analogues les toxines E 28, E 32 et E 42, tandis qu'il est faiblement antitoxique vis-à-vis

de la toxine E 34. De ces faits nous déduisons que les anticorps correspondant aux antigènes des toxines utilisées au cours de ces titrages n'existent pas dans les mêmes proportions dans les 3 sérums examinés (43).

En comparant, vis-à-vis des toxines E 28 et E 34, les valeurs antitoxiques de trois autres sérums, 295, 22 et 30, nous avons fait des constatations analogues : le sérum 295 neutralise légèrement moins bien la toxine E 28 que la toxine E 34 ; le sérum 22, au contraire, de même que les sérums 30 et 714, neutralise nettement mieux la première de ces toxines que la deuxième. Le sérum 295 titre, en effet, 200 unités anti-E 28, 250 unités anti-E 34 ; le sérum 22 titre 600 à 700 unités anti-E 28 et seulement 400 unités anti-E 34 ; le sérum 30 : 300 unités anti-E 28 et 100 à 150 unités anti-E 34.

Si nous nous reportons aussi aux résultats obtenus à Copenhague, nous remarquons des faits semblables : le sérum 7 neutralise mieux la toxine *perfringens* Prg 590 que la toxine B 35, tandis que le sérum 415 neutralise moins bien la première que la seconde.

Tous ces résultats révèlent des différences entre les proportions des anticorps dans les divers sérums anti-*perfringens* examinés.

Ajoutons à cette observation le fait important suivant, observé par J. Ipsen et sur lequel nous ne saurions trop insister : la toxine E 27, préparée à Paris, est bien neutralisée non seulement par le sérum 415 obtenu à Paris, mais aussi par les sérums 425 et VII respectivement préparés à Vienne et

(43) Nous avons jugé utile d'entreprendre le titrage des sérums anti-*perfringens*, simultanément, par le procédé *in vitro* des floculations et par la technique des injections intradermiques au lapin, dans le but de rechercher si de telles investigations, effectuées avec plusieurs échantillons de toxine *perfringens*, E 28, E 32, E 34, etc..., fourniraient des résultats tout aussi divergents que ceux que nous avons précédemment obtenus par la méthode des injections intra-veineuses à la souris. Mais les événements actuels ont interrompu ces essais comparatifs. Signalons que A. J. Weil et C. H. Parson (*Proceed. of Soc. for Exper. Biol. a. Med.*, **40**, 1939, p. 622) ont recherché le titre floculant de nombreux sérums anti-*perfringens* vis-à-vis de 4 échantillons de toxine *perfringens* liquide, concentrée. Ils ont observé une floculation atypique avec l'un des échantillons ; avec chacun des trois autres, ils ont obtenu des résultats en accord avec les titrages faits sur souris selon le procédé habituel.

à Copenhague avec les antigènes d'une souche de *B. perfringens* A autre que la souche Lechien utilisée dans notre laboratoire.

Nous avons récemment recherché la valeur antitoxique de trois de nos sérums vis-à-vis d'une toxine P 1 préparée à Copenhague suivant un procédé spécial. Etant donné que la valeur de la « dose-test » de cette toxine se présente sous un poids élevé — beaucoup plus élevé que celui qui représente la « dose-test » de nos échantillons habituels de toxine —, nous avons effectué le titrage de nos sérums en utilisant non pas une « dose-test » de la toxine P 1, mais seulement $1/2$ « dose-test » : 2 milligr. 5. (Cette quantité de toxine correspond à 25 doses mortelles pour la souris.) Les titrages effectués dans ces conditions montrent que les sérums 133 et 413 titrent 300 unités et le sérum 714 : 150 à 175 unités.

Il conviendrait de titrer ces mêmes sérums avec plusieurs autres échantillons de toxine préparés de la même manière que l'échantillon P 1, afin de juger si le mode nouveau de préparation institué par les auteurs danois permet d'obtenir des échantillons de toxine qui fournissent, au cours de l'évaluation du titre antitoxique de plusieurs sérums anti-*perfringens*, les mêmes résultats que l'échantillon P 1. Les nombreuses déterminations que nous avons réalisées avec nos échantillons de toxine ont amplement montré que les résultats des titrages de ces sérums varient fréquemment avec l'échantillon employé et que l'on ne peut, par suite, se permettre actuellement de considérer comme définitives les valeurs antitoxiques précisées avec cet unique échantillon de toxine.

*
* *

Pour bien spécifier les caractéristiques de la toxine *perfringens* A que nous préparons à partir de la souche de *B. perfringens* Lechien, nous donnerons, dans le chapitre suivant, le titre de nombreux échantillons de toxine *perfringens* liquide ou précipitée, les valeurs des « doses-test » internationale ou française de ces échantillons et les particularités que nous avons notées au cours des diverses préparations que nous avons effectuées à différentes températures.

II. — TITRE DE LA TOXINE *PERFRINGENS* A ÉLABORÉE DANS LE BOUILLON VI PAR LA SOUCHE LECHIEN.

Nous ne reviendrons pas ici sur notre mode général de préparation de la toxine *perfringens* A (alcalinisation du bouillon VI, répartition en flacons de 3 litres, addition de glucose, stérilisation, ensemencement, centrifugation après vingt-deux heures d'étuve, détermination du titre de la toxine centrifugée et précipitation de la toxine au moyen du sulfate d'ammonium). Nous mentionnerons seulement l'origine de la semence employée, le titre des toxines que nous avons préparées à des dates différentes titrages sur souris par voie veineuse et le poids de toxine que le sulfate d'ammonium précipite par litre de toxine centrifugée.

A. SEMENCE EMPLOYÉE — Pour préparer tous les échantillons de toxine *perfringens* A qui nous ont servi à immuniser des chevaux (44) ou à titrer de nombreux sérums anti-*perfringens*, nous avons toujours employé la même souche de *B. perfringens*, type A, la souche Lechien. Mais tandis que les préparations que nous avons effectuées du mois de février 1933 au mois d'avril 1939 ont été réalisées avec cette souche aussitôt après que M. Prévot ou M. Oudin lui avait fait subir 2 passages sur cobayes, toutes les préparations que nous avons faites depuis avril 1939 ont été obtenues en ensemencant le bouillon VI avec la souche Lechien n'ayant subi aucun passage sur cobaye depuis le 20 juillet 1938, mais seulement des repiquages en bouillon VI.

(44) Pour l'immunisation des chevaux, nous avons utilisé, en injections sous-cutanées, soit la toxine *perfringens* précipitée, enrobée dans la lanoline, soit l'anatoxine *perfringens* liquide. Les résultats de plusieurs séries d'expériences poursuivies depuis 1936 nous ont montré que l'immunisation est souvent aussi intense par le deuxième procédé que par le premier. Titre du sérum de différents chevaux, quatre à six semaines après le début de l'immunisation : 400-500 unités cheval 707 ; 500 unités cheval 612 ; 500-600 unités cheval 310 ; 600-700 unités chevaux 288, 714 ; 800-900 unités chevaux 295, 296, 308). Les titrages ont été effectués avec les toxines E 1, E 10, E 13 ou E 14. L'immunisation des chevaux 707, 612, 714 a été réalisée avec l'anatoxine, celle des autres avec la toxine+lanoline.

Pendant des années, la souche Lechien a été soumise au Laboratoire à 2 passages mensuels sur cobayes ; dans l'intervalle de ceux-ci, elle a été conservée à la température du laboratoire dans des tubes scellés contenant du bouillon Vf et un cube d'ovalbumine. Depuis que nous avons supprimé les passages *in vivo* avant la préparation d'un nouvel échantillon de toxine, nous commençons les bouillons, ainsi que nous l'avons dit précédemment, avec les cultures faites à partir des bacilles conservés dans les tubes scellés le 20 juillet 1938.

Depuis le 20 juillet 1938, nous n'avons repiqué la souche Lechien que 3 fois (45), dans du bouillon Vf contenant un cube d'ovalbumine ; le pH du bouillon, avant la stérilisation, était de 7,7-7,8. Un premier repiquage a été réalisé le 15 mai et le 6 septembre 1939. Nous avonsensemencé, ces jours-là, 20 tubes avec les germes de l'un des tubes scellés le 20 juillet 1938 ; le deuxième repiquage a été effectué le 28 novembre 1939, avec la culture d'un tube du 6 septembre 1939, et le troisième repiquage, le 8 mai 1940, avec la culture d'un tube du 28 novembre 1939. Tous les repiquages ont été réalisés de la même manière. Au cours de celui du 6 septembre, par exemple, les 20 tubes ensemencés ont été scellés sous le vide, puis placés à 33-34° pendant dix-huit heures. Après ce laps de temps, les tubes ont été retirés de l'étuve et mis dans un frigidaire réglé à +2°.

Du 7 septembre 1939 au 8 janvier 1940, nous avons utilisé un des tubes ensemencés le 6 septembre (culture-mère) toutes les fois que nous avons dû préparer de la toxine *perfringens* ; avant d'ouvrir le tube, nous l'avons agité pour homogénéiser la culture, puis nous avons préparé des cultures-filles dans de longs tubes de 150 cent. cubes contenant du bouillon identique à celui qui est réparti dans les flacons de 5 litres à ensemencer le lendemain. Nous laissons ces grands tubes pendant dix-huit heures à 33-34°. Le développement est rapide. Nous prélevons 30 cent. cubes de culture-fille pour ensemencer chaque flacon. Les flacons sont ensuite placés dans une étuve à température constante : la température de cette étuve a été de 33-34° dans toutes les expériences faites du 28 septembre 1939 au 20 mars 1940, de 35 ou 36° dans les expériences antérieures et de 30° dans les expériences actuelles (voir tableau III). Les cultures des flacons sont centrifugées vingt-deux heures après l'ensemencement et la toxine est précipitée aussitôt après la centrifugation.

B. TITRE DE LA TOXINE PERFRINGENS LIQUIDE. — En déterminant, aussitôt après la centrifugation, la toxicité des 38 dernières préparations de toxine *perfringens* effectuées avec la souche de *B. perfringens* non soumise à des passages sur cobayes, nous avons noté les résultats suivants :

(45) Nous évitons les repiquages rapprochés. S. Selewinskaja et N. Kaschinszewa ont signalé que les ensemencements fréquents abaissent fortement les propriétés toxigènes du *B. perfringens*. (*Centralb. f. Gesam. Hyg.*, 41, 1938, p. 566.)

TABLEAU III. — Titre de la toxine *perfringens* liquide. Dose minima mortelle de la toxine *perfringens* précipitée par le sulfate neutre d'ammonium.

SEMENCE EMPLOYÉE	ECHANTILLON	TEMPÉRATURE DE L'ÉTUVE (en degrés)	TITRE DE LA TOXINE LIQUIDE (dose minima mortelle par centimètre cube)	TOXINE <i>perfringens</i> précipitée		
				Par litre de culture centrifugée (en grammes)	Dose minima mortelle (en milligramme)	Quantité obtenue p. 100
<i>B. perfringens</i> A, souche Lechien	de toxine					
Après deux passages mensuels sur cobayes.	E ₁₄ (13 mai 1937).	35-36	20	0,350	0,08	34,3
	P ₈ (26 mai 1937).	35-36	20	0,720	0,10	36
	E ₁₆ (4 oct. 1937).	35-36	30	1,090	0,09	40,4
	P ₁₁ (22 nov. 1937).	35-36	20	1,750	0,12	72,9
	P ₁₃ (22 déc. 1939).	35-36	30	0,560	0,06	31,1
	E ₁₉ (17 fév. 1938).	35-36	20	0,510	0,08	31,8
	E ₂₀ (7 avril 1938).	35-36	20	0,630	0,06	32,5
	E ₂₃ (18 août 1938).	35-36	20	0,625	0,08	39,6
	E ₂₄ (30 sept. 1938).	35-36	40	0,485	0,08	15,1
	E ₂₅ (27 oct. 1938).	35-36	20	0,370	0,04	71,2
	E ₂₆ (5 nov. 1938).	35-36	40-50	0,900	0,045	
	E ₂₆ (12 déc. 1938).	35-36	10	0,720	0,14	51,4
	E ₂₇ (16 fév. 1939).	35	10-20	0,450	0,09	
	E ₂₈ (20 fév. 1939).	35	10	0,720	0,08	90
	E ₂₉ (27 mars 1939).	35	30	1,625	0,08	67,7
	Repiquage du 15 mai 1939.	E ₃₀ (16 mai 1939).	35	1,370	0,11	
Cultures du 20 juillet 1938.	E ₃₁ (13 sept. 1939).	35	35	0,910	0,045	57,7
	E ₃₂ (15 sept. 1939).	35	30	0,525	0,08	21,8
	E ₃₃ (21 sept. 1939).	35	20	0,750	0,045	83,3
	E ₃₄ (26 sept. 1939).	35	40	0,910	0,035	65
	E ₃₅ (28 sept. 1939).	33-34	20	0,980	0,075	63,1
	E ₃₆ (12 oct. 1939).	33-34	50	1,550	0,055	56,5
	E ₃₇ (18 oct. 1939).	33-34	40	2,650	0,07	94,6
	E ₃₈ (2 nov. 1939).	33-34	35-40	0,960	0,055	
	E ₃₉ (22 nov. 1939).	33-34	35	1,275	0,085	42,5
	E ₄₀ (22 nov. 1939).	33-34	35	0,725	0,055	37,6
	E ₄₁ (21 nov. 1939).	33-34	20-30	1,450	0,065	
	E ₄₂ (29 nov. 1939).	33-34	30	3,375	0,13	86,5
	E ₄₂ (7 déc. 1939).	33-34	40		0,065	76,9
	P ₃₀ (20 déc. 1939).	33-34	30	3,310	0,12	97,5
	E ₄₃ (20 déc. 1939).	33-34	30	1,410	0,055	85,4
Repiquage du 28 nov. 1939.	E ₄₄ (10 janv. 1940).	33-34	30	1,450	0,08	60,1
	E ₄₅ (21 fév. 1940).	33-34		0,915	0,07	
	E ₄₅ (22 fév. 1940).	33-34	30-40			
	E ₄₅ (18 mars 1940).	33-34	40			
	E ₄₅ (29 mars 1940).	33-34	20-30			
	E ₄₅ (3 avril 1940).	30	30			
	E ₄₅ (28 mai 1940).	30	35			

- 2 préparations ont contenu, par centimètre cube, 10 à 20 doses mortelles.
- 15 préparations : 20 ou 20 à 30 doses mortelles par centimètre cube.
- 18 préparations : 30, 40 ou 40 à 50 doses mortelles par centimètre cube.
- 2 préparations : 50 doses mortelles par centimètre cube.
- 1 préparation : 50 à 60 doses mortelles par centimètre cube.

En résumé, 36 préparations sur 38 ont contenu 20 à 60 doses mortelles par centimètre cube (expériences en flacons de 5 litres).

Les 45 préparations précédentes, faites à partir de la souche ayant subi des passages sur cobayes, avaient fourni les résultats suivants :

- 7 contenaient 5 à 10 doses mortelles par centimètre cube.
- 11 contenaient 10 à 20 doses mortelles par centimètre cube.
- 14 contenaient 20 à 30 doses mortelles par centimètre cube.
- 7 contenaient 30 à 50 doses mortelles par centimètre cube.

Soit 21 préparations sur 45, contenant 20 à 50 doses mortelles par centimètre cube.

La comparaison de ces chiffres indique que le pouvoir toxigène de la souche Lechien n'a pas faibli depuis la suppression des passages sur cobayes (46). Ajoutons qu'il en est de même pour le pouvoir pathogène. Signalons aussi que l'anatoxine *perfringens* préparée à partir de la toxine élaborée en bouillon Vf par cette souche permet toujours, en quatre à six semaines, l'*immunisation intense* des chevaux (47).

(46) Nous avons aussi supprimé les passages sur cobayes des souches *Vibrion septique*, *histolytique* et *œdematiens* qui nous servent couramment à préparer les toxines correspondantes. Voici le titre des toxines, exprimé en doses mortelles (D. M.) par centimètre cube que nous obtenons maintenant :

Toxine Vibrion septique : Sur 33 préparations en flacons de 5 litres, 9 ont contenu, par centimètre cube, 100 à 200 D. M. ; 14 : 200, 250 ou 250 à 300 D. M. ; 9 : 300 ou 300 à 400 D. M. ; et une préparation : 400 D. M. par centimètre cube.

Toxine histolytique : Sur 36 préparations, 3 ont contenu 75 ou 75 à 100 D. M. par centimètre cube ; 18 : 100 ou 150 à 200 D. M. ; 14 : 200 ou 200 à 300 D. M. ; et une préparation : 300 D. M.

Toxine œdematiens : Sur 44 préparations, 6 ont contenu, par centimètre cube, 2.000 ou 2.000 à 3.000 D. M. ; 20 : entre 3.000 et 6.000 D. M. ; 17 : entre 6.000 à 8.000 ou 8.000 à 12.000 D. M. ; et une préparation : 12.000 D. M. par centimètre cube.

(47) Voici le titre de quelques sérums, quatre à six semaines après le début de l'immunisation : 500 unités (chevaux 22, 39, 40) ; 500-600 unités

Les chiffres des premières colonnes du tableau III précisent le titre de quelques-unes des toxines *perfringens* que nous avons préparées, l'origine de la semence employée et la température des étuves où sont placés les flacons ensemencés.

Les trois dernières colonnes de ce tableau indiquent la valeur de la dose minima mortelle de la toxine précipitée par le sulfate d'ammonium et le poids de toxine obtenu.

C. TOXINE PERFRINGENS PRÉCIPITÉE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM. — Nos différents échantillons de toxine *perfringens* précipitée ont été titrés après dessiccation dans les conditions que nous avons indiquées dans un travail antérieur.

a) *Dose minima mortelle.* — La dose minima mortelle moyenne de 38 de nos échantillons de toxine *perfringens* précipitée par le sulfate d'ammonium pur a été de 0 milligr. 08. Parmi ces échantillons, 45 ont été préparés à partir des cultures centrifugées après vingt-deux heures d'étuve à 33-36° ; les 13 autres proviennent des cultures effectuées à 33-34°. La dose minima mortelle *moyenne* de ces 13 derniers échantillons est de 0 milligr. 075. En consultant le tableau III on voit, par exemple, que :

La dose minima mortelle des 4 échantillons E 36, E 38, E 40, E 43 est de 0 milligr. 055 ;

La dose minima mortelle des 2 échantillons E 41, E 42 est de 0 milligr. 065 ;

La dose minima mortelle des 2 échantillons E 37, E 45 est de 0 milligr. 07 ;

La dose minima mortelle des 2 échantillons E 39, E 44 est de 0 milligr. 08 et 0 milligr. 085.

Dans nos expériences, *la quantité de toxine précipitée* par litre de culture centrifugée a varié entre 0 gr. 350 et 3 gr. 375.

(chevaux 33, 34, 35, 37) ; 600 unités (26, 32, 173) ; 600-700 unités (cheval 38).

Ce degré d'immunisation a été obtenu en injectant, tous les sept jours, des doses croissantes d'anatoxine : 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 cent. cubes. Signalons que les injections suivantes, faites toutes les cinq semaines, après deux saignées de 6 litres de sang, peuvent déterminer encore un accroissement du titre antitoxique des sérums : ainsi le sérum du cheval 22 a atteint les taux de 700, 800, puis 1.000 unités après la huitième, neuvième et onzième injection (titrages avec les toxines E 27, E 28).

La moyenne de 42 préparations effectuées à partir des cultures centrifugées après vingt-deux heures d'étuve à 35° est de 0 gr. 860 ; celle des 13 préparations provenant des cultures à 33-34° est de 1 gr. 695.

Dans le tableau III, nous signalons quelques-uns de nos résultats : le 13 septembre, par exemple, nous avons obtenu, par litre de toxine centrifugée, 0 gr. 910 d'une toxine dont la dose minima mortelle a été de 0 milligr. 045 (échantillon E 31) et le 15 septembre nous avons seulement récolté, dans les mêmes conditions, 0 gr. 525 de toxine ayant comme valeur de la D. M. M. 0 milligr. 08 (échantillon E 32). Par contre, le 18 octobre, nous avons obtenu après vingt-deux heures d'étuve à 33-34°, 2 gr. 650 de toxine E 37 ; la dose minima mortelle de cet échantillon est de 0 milligr. 07.

H. Henry et M. Lacey ont (48) précipité la toxine *perfringens* en ajoutant à la toxine liquide des quantités variables de sulfate d'ammonium. Ils ont obtenu, en employant 500 grammes de sulfate pur par litre de toxine, un précipité renfermant jusqu'à 54 p. 100 de la toxine présente dans la culture centrifugée.

Celareck et Stetckiewicz (49) ont comparé l'intensité des effets hémolytiques et toxiques des toxines *perfringens* précipitées par le sulfate d'ammonium ou adsorbées par l'acide benzoïque en solution saturée dans l'acétone (50). Ils ont signalé, d'une part, que la toxine précipitée par le sulfate est moins hémolytique que la toxine adsorbée par l'acide benzoïque (expériences sur globules de lapin) et, d'autre part, que le rendement en toxine est meilleur par le procédé à l'acide benzoïque que par celui au sulfate d'ammonium.

Hosoya et Miyata (51), Hosoya, Stefanopoulos et Miyata (52), au cours de leurs recherches sur la nature des toxines tétanique, diphtérique et botulinique, ont indiqué un procédé de précipitation au chlorure de zinc et purification ultérieure par précipitation au moyen de l'acétate et du chlorure de zinc qui leur a donné des résultats constants pour les trois toxines indiquées.

Ainsi que nous l'avons dit, tous les échantillons de toxine

(48) HENRY (H.) et LACEY (M.). *Journ. Path. a. Bact.*, **23**, 1920, p. 281.

(49) CELARECK (J.) et STETCKIEWIECZ (S.). *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 143.

(50) D'après le procédé de précipitation et de purification de l'anatoxine diphtérique mis au point par T. Spasowicz et Wl. Porebski. *C. R. Soc. de Biol.*, **143**, 1933, p. 1267.

(51) HOSoya (S.) et MIYATA (S.). *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 773 et 1297.

(52) HOSoya (S.), STEFANOPOULO (G. J.) et MIYATA (S.). *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 1465.

perfringens que nous avons utilisés jusqu'à présent, pour le titrage des sérums anti-*perfringens*, ont été précipités par le procédé au sulfate d'ammonium (53). Lorsque nous n'avons eu que de petites quantités de toxine à précipiter nous avons additionné la toxine *perfringens* liquide de 700 grammes par litre de sulfate neutre d'ammonium pur. Mais, quand nous avons dû précipiter 8 litres de toxine ou un multiple de ce nombre, nous avons employé 5 kilogrammes de sulfate d'ammonium par portions de 8 litres de liquide, c'est-à-dire 625 grammes de sulfate par litre de toxine : le mélange est agité modérément pendant quinze minutes environ (54), à la température du laboratoire, pour accélérer la dissolution du sulfate, puis il est laissé au repos durant cinq à dix minutes ; pendant ce temps toute la toxine précipitée se rassemble à la surface du liquide et un léger excès de sulfate reste non dissous au fond du récipient. La toxine précipitée est alors recueillie, égouttée dans une boîte de Petri ou longuement essorée sur la plaque poreuse d'un filtre en verre d'Iéna, puis desséchée.

Nous avons calculé, dans 28 expériences, le pourcentage de toxine que précipite le sulfate d'ammonium. Dans le tableau III, nous donnons, en même temps que le titre de la toxine liquide (exprimée en D. M. M. par centimètre cube), le poids sec de toxine précipitée par litre de culture centrifugée, la valeur de la D. M. M. de la toxine sèche et le pourcentage de toxine précipitée. De ce tableau, il ressort que, dans 9 expériences, le précipité a respectivement contenu 72.9, 72.1, 90, 83.3, 94.6, 86.5, 76.9, 97.5, 85.4 p. 100 de la toxine existant dans la culture centrifugée et que, dans 19 autres, nous n'avons retrouvé dans la toxine précipitée que 15 à 67 p. 100 de la toxine présente dans le liquide de centrifugation non additionné de sulfate. La quantité

(53) Au cours de deux essais comparatifs, effectués avec M^{lle} Kréguer, nous avons constaté que le procédé au sulfate d'ammonium permet d'obtenir plus de toxine que le procédé à l'acide benzoïque ; aussi continuons-nous à précipiter la toxine *perfringens* au moyen de sulfate neutre d'ammonium.

(54) Nous avons maintes fois vérifié qu'une durée d'agitation plus longue et l'emploi d'une plus grande quantité de sulfate n'augmentent pas l'abondance du précipité de toxine *perfringens*.

moyenne de toxine précipitée au cours de ces 28 préparations a été de 58,1 p. 100 (55).

b) « Dose-test ». — Nous avons déterminé, au moyen du sérum étalon international, la « dose-test » de 34 de nos échantillons de toxine *perfringens* ; en faisant la moyenne

TABLEAU IV. — Détermination de la « dose-test »
d'un échantillon de toxine *perfringens* A.

COMPOSITION des mélanges préparés pour 5 souris				COMPOSITION du mélange injecté à 1 souris (0 c.c. 5)		RÉSULTATS (1)		
Sérum étalon (solution à 5 unités antitoxiques par c.c.) en c.c.	Toxine (solution à 5 milligrammes par c.c.) en c.c.	Eau physiologique en centimètre cube	Volume total en centimètres cubes	Sérum (unité antitoxique)	Toxine en milligramme	Premier titrage	Deuxième titrage	Survies au cours des 2 titrages
1	1	0,5	2,5	1	1	— —	+ — — —	5 sur 6.
1	1,1	0,4	2,5	1	1,1		+ + — —	2 sur 4.
1	1,2	0,3	2,5	1	1,2	++	+ + + +	0 sur 6.

(1) Le nombre de signes — indique le nombre de souris ayant survécu. Le nombre de signes + indique le nombre de souris mortes.

des résultats de ces 34 titrages, nous avons constaté que la « dose-test internationale » de la toxine *perfringens* élaborée dans le bouillon Vf par notre souche de *B. perfringens* est en

(55) L'addition de 625 grammes de sulfate d'ammonium pur par litre de toxine Vibrion septique, histolytique ou *œdematiens*, a respectivement précipité, dans nos essais, 64,3 p. 100 de la toxine Vibrion septique présente dans le liquide (moyenne de 10 préparations), 58,6 p. 100 de la toxine histolytique (moyenne de 5 préparations), ou 56,6 p. 100 de la toxine *œdematiens* (moyenne de 7 préparations). La dose minima mortelle des toxines précipitées a été de :

0 milligr. 07 dans le cas de la toxine Vibrion septique (moyenne de 14 préparations) ;

0 milligr. 03 dans le cas de la toxine histolytique (moyenne de 14 préparations) ;

0 milligr. 004 dans le cas de la toxine *œdematiens* (moyenne de 14 préparations).

TABLEAU V. — Dose minima mortelle et « dose-test » de 24 échantillons de toxine *perfringens*. Nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test ».

ÉCHANTILLON de toxine	pH avant l'ensemencement	DOSE minima mortelle en milligramme	« DOSE-TEST INTERNATIONALE » en milligrammes	NOMBRE de doses minima mortelles dans 1 dose-test
E ₃₄	7,6	0,033	1,05	30
E ₃₁	7,65	0,045	1,2	26,6
E ₃₃	7,6-7,65	0,045	1,3	28,8
P ₃₅		0,055	1,35	24,5
E ₄₀	7,65	0,055	1,5	27,2
E ₃₆	7,65-7,7	0,055	1,6	29
E ₄₃	7,6	0,055	1,85	33,6
E ₃₈	7,6	0,055	1,9	34,5
E ₃₂		0,06	1,45	24
P ₂₆		0,06	1,6	26,6
P ₂₄		0,06	1,7	28,3
E ₄₁	7,65-7,7	0,065	1,9	29,2
E ₄₂	7,5	0,065	2,55	39,2
E ₃₇	7,65-7,7	0,07	2,6	37,1
E ₃₅	7,55	0,075	1,3	17,3
E ₁₃		0,075	1,7	22,6
E ₃₂	7,7-7,8	0,08	1,1	13,6
E ₁₇		0,08	1,4	17,5
E ₂₈		0,08	1,7	21,2
E ₁₄		0,08	1,8	22,5
E ₂₃		0,08	2,7	33,7
E ₃₀	7,55	0,085	2,15	25,3
E ₁₆		0,09	1,8	20
E ₁₀		0,09	2,8	31,1

moyenne de 1 milligr. 9. Les chiffres extrêmes que nous avons notés ont été de 1.05 et de 3 milligr. 2 : les « doses-test » de 10 de ces échantillons se sont échelonnées entre 1.05 et 1,45 ; celles de 12 autres entre 1,6 et 1,9 ; celles de 10, entre 2,15 et 2,9 ; la « dose-test » des deux échantillons restants a été de 3 milligr. 2. Nous indiquons, dans le tableau IV, le mode d'exécution et les résultats d'un de ces titrages (détermination de la « dose-test » de l'échantillon de toxine E 32).

Dans le tableau V, nous donnons les valeurs de la « dose-

test internationale » de 24 échantillons de toxine groupés d'après l'ordre de grandeur de leur dose minima mortelle ; ce classement permet de constater aisément que plusieurs échantillons de toxine *perfringens* dont la dose minima mortelle se présente sous le même poids ont des « doses-test » différentes. En voici trois exemples : la dose minima mortelle des échantillons P 25 et E 38 est de 0 milligr. 055 ; la « dose-test » de la toxine P 25 est de 1 milligr. 35, celle de la toxine E 38 est de 1 milligr. 9. La valeur de la dose minima mortelle des toxines E 41 et E 42 est de 0 milligr. 065 ; les valeurs respectives de la « dose-test » de ces toxines sont : 1 milligr. 9 et 2 milligr. 5. La D. M. M. des toxines E 23 et E 32 est de 0 milligr. 08, la « dose-test » de E 23 est de 2 milligr. 7 et celle de la toxine E 32 est de 1 milligr. 4.

La dernière colonne du tableau V indique le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test internationale » de 27 échantillons de toxine *perfringens*. Ces chiffres montrent que le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test » n'est pas constant : il varie entre 13 (toxine E 32) et 39 (toxine E 42).

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, nous avons déterminé la « dose-test » de 34 échantillons de toxine. En faisant le relevé des résultats de ces titrages nous avons constaté que : 1 dose-test de 5 échantillons contient entre 13 et 20 doses mortelles ; 1 dose-test de 20 échantillons contient de 20 à 30 doses mortelles ; 1 dose-test de 9 échantillons contient de 30 à 39 doses mortelles.

De ces 34 titrages il ressort que dans 50 p. 100 des cas une « dose-test internationale » de nos échantillons de toxine *perfringens* représente 20 à 30 doses mortelles et dans 26 p. 100 des cas 30 à 39 doses mortelles (56).

(56) En déterminant la « dose-test » de 11 échantillons de toxine Vibrion septique, nous avons constaté aussi qu'une « dose-test » ne représente pas un nombre fixe de doses mortelles. Tandis qu'une « dose-test » de l'échantillon V 1 contient 20 doses mortelles, une « dose-test » de l'échantillon V 9 en contient 62. Les autres titrages nous ont montré qu'une « dose-test » de toxine Vibrion septique contient le plus souvent 32 à 45 doses mortelles pour la souris.

Le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test internationale » de toxine histolytique est compris, en général, entre 30

Nous faisons figurer dans le tableau V non seulement des toxines qui diffèrent par la valeur de la « dose-test », mais encore des échantillons qui ont des « doses-test » égales ou très voisines : par exemple, la « dose-test internationale » des échantillons E 31, E 33, E 35 est de 1,2 ou 1 milligr. 3 : celle des échantillons E 23, E 37, E 42, est de 2,7 2,6 ou 2,55. Le fait que plusieurs échantillons de toxine ont la même « dose-test » permet-il de conclure que ces échantillons ont sûrement la même constitution antigénique ? Les résultats que l'on obtient en déterminant d'une part, le titre antitoxique des sérums thérapeutiques vis-à-vis de ces toxines (tableau II), d'autre part, la « dose-test » de ces échantillons avec un deuxième sérum étalon titré exactement par rapport au premier (tableau VI), apportent une réponse à cette question. Ils attestent, ainsi que nous allons le voir, que *des échantillons de toxine qui sont comparables par la valeur de la « dose-test internationale » n'ont pas nécessairement la même constitution antigénique* (57).

L'examen attentif des chiffres du tableau VI met en évidence que *des échantillons de toxine perfringens qui sont comparables par la valeur de la « dose-test internationale » peuvent avoir des « doses-test françaises » très différentes*. La « dose-test internationale » des échantillons E 33 et E 35 est de 1 milligr. 3 ; la « dose-test française » du premier est de 0 milligr. 75 et celle du deuxième de 1 milligr. 15.

La « dose-test internationale » des échantillons E 38 et E 41 est de 1 milligr. 9. La « dose-test française » de la toxine E 38 est de 1 milligr. 3 et celle de la toxine E 41 est de 2 milligrammes.

La « dose-test internationale » des toxines E 37 et E 42 est, respectivement, de 2 milligr. 6 et 2 milligr. 55. Les « doses-

et 40 ; chiffres extrêmes : 28 et 60 (titrages sur souris, voie veineuse). Une « dose-test française » de toxine *œdematians* contient généralement entre 100 et 200 doses mortelles ; chiffres extrêmes : 60 et 360 (titrages sur souris, voie sous-cutanée).

(57) Par contre, des échantillons de toxine qui contiennent des quantités différentes d'impuretés et qui, par suite, se distinguent par les valeurs de la dose minima mortelle et de la « dose-test », peuvent cependant posséder des constitutions antigéniques analogues.

TABLEAU VI. — Dose minima mortelle et valeurs comparées des « doses-test » internationale et française de quelques échantillons de toxine *perfringens*.

SEMENCE EMPLOYÉE (<i>B. perfringens</i> A souche Lechien)	ÉCHANTILLON de toxine <i>perfringens</i> A	DOSE MINIMA MORTELLE en milligr.	« DOSE-TEST » déterminée avec un sérum étalon		RAPPORT « dose-test danoise » « dose-test française »
			DANOIS en milligr.	FRANÇAIS en milligr.	
Après deux passages sur cobayes.	P ₂₄ (déc. 1938).	0,06	1,7	0,65	2,6
	E ₂₇ (16 fév. 1939).	0,09	1,8	1,2	1,5
	E ₂₈ (20 mars 1939).	0,08	1,7	1,2	1,4
	E ₂₉ (27 mars 1939).	0,08			
Culture du 20 juillet 1938. repiquée le 6 sept. 1939.	E ₃₀ (12 oct. 1939).	0,055	1,6	1,75	0,91
	E ₄₁ (29 nov. 1939).	0,065	1,9	2	0,95
	E ₃₁ (13 sept. 1939).	0,045	1,2	1,2	1
	E ₃₇ (18 oct. 1939).	0,07	2,6	2,6	1
	E ₄₀ (22 nov. 1939).	0,055	1,5	1,5	1
	E ₃₂ (15 sept. 1939).	0,08	1,1	0,8	1,37
	E ₃₃ (21 sept. 1939).	0,045	1,3	0,75	1,7
	E ₃₄ (26 sept. 1939).	0,035	1,05	0,65	1,61
	E ₃₅ (28 sept. 1939).	0,075	1,3	1,15	1,13
	E ₃₈ (2 nov. 1939).	0,055	1,9	1,3	1,5
	E ₃₉ (22 nov. 1939).	0,085	2,15	1,9	1,13
	E ₄₂ (7 déc. 1939).	0,065	2,55	1,5	1,7
	E ₄₃ (20 déc. 1939).	0,055	1,85	1,15	1,6

test françaises » respectives de ces échantillons sont de 2 milligr. 6 et 1 milligr. 55.

Réciproquement, deux échantillons de toxine qui sont également neutralisés par l'unité antitoxique du sérum étalon français peuvent différer par la valeur de leur « dose-test internationale ».

Exemple : la « dose-test française » des toxines E 35 et E 43 est de 1 milligr. 15 ; la « dose-test internationale » de la première est de 1 milligr. 3 et celle de la deuxième 1 milligr. 85.

Les résultats du tableau II précisent les valeurs antitoxiques de quelques sérums vis-à-vis d'un certain nombre de ces échantillons. Les titrages effectués avec les toxines E 37 et E 42 — toxines qui ne diffèrent que par les valeurs de la « dose-test française » — ont fourni les résultats suivants :

le sérum 445 titre 450-500 unités anti-E 37 et seulement 250 à 300 unités anti-E 42. Le même sérum, d'après les titrages réalisés avec les toxines E 33 et E 35, qui diffèrent aussi par les valeurs de la « dose-test française » titre 350 unités vis-à-vis de la toxine E 33 et 450 unités vis-à-vis de la deuxième. Les résultats de ces titrages et ceux de la détermination de la « dose-test » avec deux sérums étalons permettent de déduire que la toxine E 33 diffère de la toxine E 35 et, de même, que les toxines E 37 et E 42 sont différentes. Ces observations montrent que l'égalité des résultats obtenus au cours de la détermination de la « dose-test » de deux échantillons de toxine *perfringens* au moyen d'un seul sérum étalon n'autorise pas à conclure à la similitude de constitution antigénique de ces deux échantillons.

En examinant méthodiquement le tableau VI, dans lequel nous indiquons les « doses-test » de 16 échantillons de toxine, déterminées comparativement avec les sérums étalons danois et français, nous voyons que le sérum français neutralise dans 9 cas moins de toxine que le sérum danois, dans 4 cas un poids de toxine voisin de celui qui est neutralisé par ce sérum (échantillons E 36, E 41, E 35, E 39), et dans les 3 cas restants exactement le même poids que le sérum danois (échantillons E 31, E 37, E 40). En effet :

1° La valeur de la « dose-test danoise » des échantillons E 27, E 28, E 33, E 34, E 35, E 38, E 42, E 43, est supérieure à la valeur de la « dose-test française ». La « dose-test française » de l'échantillon E 28, par exemple, est de 1 milligr. 7, alors que la « dose-test française » de cet échantillon est de 1 milligr. 2 seulement. Le rapport entre les valeurs de ces deux « doses-test » est de 1,4. L'écart entre les valeurs trouvées avec les deux sérums étalons peut être plus prononcé que dans cet exemple. Dans le cas des échantillons E 33, E 34, E 42 et E 43, le rapport : « dose-test danoise » / « dose-test française » atteint en effet la valeur de 1,6 et 1,7.

2° La valeur de la « dose-test » des échantillons E 36, E 41, déterminée avec le sérum étalon danois, est légèrement inférieure à celle qui est obtenue dans les titrages effectués avec le sérum étalon français.

3° La valeur de la « dose-test » des toxines E 31, E 37, E 40, est indépendante du sérum étalon employé pour faire la détermination : une unité antitoxique du sérum danois ou du sérum français neutralise 1 milligr. 2 de la toxine E 31, 2 milligr. 7 de la toxine E 37 et 1 milligr. 5 de la toxine E 40. Ces résultats attestent que le sérum étalon français est exactement titré par rapport à l'étalon danois.

En résumé, le sérum étalon français neutralise moins bien que le sérum danois les toxines E 28, E 23, E 34, E 42, E 43 par exemple, aussi bien que ce dernier les toxines E 31, E 37, E 40, et légèrement mieux que le sérum danois les toxines E 36 et E 41.

L'ensemble des résultats que nous venons de rapporter confirme nos premières observations ; ils montrent une fois de plus que la valeur de la « dose-test » d'un même échantillon de toxine peut varier avec le sérum étalon employé au cours du titrage de la toxine ; ils attestent des différences de composition non seulement entre les sérums étalons utilisés, mais encore entre les toxines examinées. Les nombreux exemples que nous avons déjà donnés dans un travail précédent (58) et ceux que nous rapportons ici montrent que ce fait est extrêmement fréquent.

*
* *

Pour préparer les 13 échantillons de toxine *perfringens* E 31, E 32, ..., E 43, indiqués dans le tableau VI, nous avonsensemencé les bouillons avec la souche Lechien n'ayant subi qu'un seul repiquage depuis le 20 juillet 1938.

Les différences importantes qui existent entre les valeurs de la « dose-test » internationale et française des échantillons E 34, E 38, E 42 par exemple, tous préparés cependant de la même manière, en utilisant comme semence initiale les microbes des cultures-mères réalisées le même jour (6 septembre) et en effectuant la précipitation des toxines centrifugées après le même nombre d'heures d'étuve à 33-34° indiquent que la composition de ces échantillons est différente *malgré les conditions analogues d'ensemencement, d'incubation et de précipitation*.

Au cours de toutes nos recherches sur le titrage des toxines *perfringens*, nous avons ainsi décelé des différences de constitution antigénique entre de nombreux échantillons de toxine. Insistons sur le fait que de telles variations existent non seulement entre les échantillons que nous avons préparés à des dates éloignées, dans des *lots différents de bouillon Vf*, mais encore, ainsi que nous le développerons plus loin, entre des échantillons que nous avons obtenus à partir de volumes égaux du même bouillon Vf stérile, ensemencés à peu de

(58) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *Revue d'Immunologie*, 55, 1939, p. 18, tableau V.

jours d'intervalle dans des conditions apparemment aussi identiques que possible. Nous n'en signalerons ici qu'un seul exemple, celui des toxines E 31 et E 32, préparées le 13 et le 15 septembre de la même manière : même bouillon, même semence initiale, même durée d'incubation à 33-34°, même mode de précipitation et de dessiccation.

La dose minima mortelle de la toxine E 31 est de 0 milligr. 045, celle de la toxine E 32 est de 0 milligr. 08.

La « dose-test » internationale ou française de l'échantillon E 31 est de 1 milligr. 2 ; la « dose-test internationale » de l'échantillon E 32 est de 1 milligr. 1, alors que la « dose-test française » de ce même échantillon n'est que de 0 milligr. 8. Ces chiffres permettent de penser que les divers constituants antigéniques des toxines E 31 et E 32 figurent à des taux différents dans ces deux toxines. Les résultats que nous avons obtenus lorsque nous avons utilisé celles-ci pour titrer un sérum thérapeutique ont nettement corroboré cette déduction. Si nous nous reportons au tableau II, nous voyons que le sérum 135 titre 150 à 175 unités lorsque le titrage est fait avec une « dose-test internationale » de E 31 et seulement 40 à 50 unités lorsque la détermination est effectuée avec une « dose-test internationale » de l'échantillon E 32. Les résultats très discordants notés au cours de ce titrage prouvent avec évidence qu'il existe de profondes différences entre les toxines E 31 et E 32 préparées à deux jours d'intervalle dans des volumes égaux du même bouillon.

L'ensemble de nos recherches montre que le métabolisme de notre souche de *B. perfringens* (souche Lechien) présente une extrême variabilité : elle élabore, dans le bouillon Vf, non seulement des quantités plus ou moins grandes de toxine (59), mais, ce qui est plus important, des exotoxines

(59) La souche Lechien que nous utilisons fournit, suivant les bouillons Vf ensemencés, après vingt-deux heures d'étuve à 30, 33 ou 35°, des toxines de nocivité plus ou moins élevée, contenant en effet, ainsi que nous l'avons mentionné précédemment, soit 20 ou 30 D. M. M. par centimètre cube, soit 10 D. M. M. seulement, soit au contraire 40, 45 et même 50 à 60 D. M. M.

Nous avons fait quelques expériences comparatives en vue de déterminer si, dans les bouillons Vf recouverts d'une couche d'huile de vaseline, la souche Lechien produirait des quantités plus grandes de

complexes dont les diverses propriétés (hémolytique, neurotoxique, nécrosante, etc....) sont à tel point inégalement accusées qu'elles rendent aléatoire le problème de la standardisation de ces toxines avec différents sérums étalons et celui du titrage des sérums eux-mêmes.

Pour souligner mieux encore les particularités de la toxine *perfringens*, nous insisterons sur les points suivants :

A. — Tandis que les propriétés des toxines *perfringens* A élaborées dans des bouillons Vf préparés à des dates variées peuvent différer beaucoup, les échantillons de toxine Vibron septique obtenus à partir des mêmes bouillons ont des propriétés comparables. La « dose-test internationale » de l'un quelconque de ces échantillons est pratiquement égale à la « dose-test française ». Quant au titrage des toxines histolytiques, préparées dans des lots différents de bouillon Vf, nos recherches ont établi que les déterminations effectuées comparativement avec le sérum étalon international et le sérum étalon français fournissent des résultats tout à fait concordants. Cette donnée résulte de l'examen de 12 échantillons de toxine histolytique. (Les chiffres des deux dernières colonnes du tableau VI indiquent, au contraire, des discordances fréquentes et non négligeables entre les valeurs des « doses-test » de quelques échantillons de toxine *perfringens* titrés avec deux sérums étalons, danois et français.)

B. — Des volumes égaux du même bouillon Vf, amenés à pH 7,7-7,8 à plusieurs jours d'intervalle et ensemencés à des dates différentes, mais de la même manière, contiennent,

toxine *perfringens* que dans le bouillon Vf ordinaire. (Les quantités de bouillon ensemencées dans ces expériences ont été de 4 litres et, comme d'habitude, le bouillon stérilisé a été préalablement chauffé à 100°, puis rapidement amené à 35° avant l'ensemencement.) Au cours de ces essais, nous avons obtenu des toxines titrant 30 D. M. M. par centimètre cube, que le bouillon soit ou non protégé par une couche d'huile de vaseline.

Dans une expérience, nous avons constaté que le bouillon Vf additionné, par litre, de l'extrait aqueux stérile de 4 grammes de levure riche en vitamines B, est plus favorable à la production de la toxine *perfringens* que le bouillon Vf ordinaire. Nous avons obtenu, dans le premier, 30 D. M. M. de toxine par centimètre cube de culture centrifugée après vingt-deux heures d'étuve à 37° et, dans le deuxième, 20 D. M. M. par centimètre cube. (L'extrait de levure est amené à pH 7,7-7,8 avant de le stériliser par filtration sur bougie.)

après vingt-deux heures d'étuve, des toxines dont les doses minima mortelles peuvent varier du simple au double (voir tableau VII).

En voici deux exemples :

1° Le bouillon Vf préparé le 7 septembre a été divisé en quatre parties que nous avons respectivementensemencées le 13, le 15, le 21 et le 26 septembre. (La veille de l'ensemencement, chaque partie a été amenée à pH 7,7-7,8, puis distribuée en flacons de 3 litres, additionnée de 1 p. 1.000 de glucose et finalement stérilisée.) Le jour de l'ensemencement, les flacons ont été d'abord portés pendant trente minutes à 100°, puis rapidement amenés à 33° et enfinensemencés avec 30 cent. cubes d'une culture de dix-huit heures de *B. perfringens*, effectuée dans du bouillon identique à celui des flacons. Les cultures ont été centrifugées après vingt-deux heures d'étuve à 33°. La dose minima mortelle de l'échantillon de toxine E 32, préparée à partir du bouillonensemencé le 13 septembre, a été de 0 milligr. 08, celle des échantillons E 31 et E 33 préparés le 13 et le 21 septembre, a été de 0 milligr. 043 et celle de l'échantillon E 34 de 0 milligr. 035 (60). La dose minima hémolytique de la toxine E 32 est de 0 milligr. 0009 et celle de la toxine E 33 est de 0 milligr. 0004.

2° Le bouillon du 24 novembre a été divisé le 3 décembre en deux moitiés que nous avons soumises, à un jour d'intervalle, aux manipulations habituelles d'alcalinisation, de glucosage et de stérilisation ; nous les avonsensemencées un jour plus tard, le 6 et le 7 décembre. Les centrifugations ont été faites après vingt-deux heures d'étuve à 33-34° et la précipitation au moyen du sulfate d'ammonium réalisée aussitôt après chaque centrifugation.

(60) Les chiffres du tableau II montrent que le titre du sérum 135 est de 40-50 unités ou de 125 unités, suivant que le titrage est réalisé avec la toxine E 32 ou avec la toxine E 33 ; celui du sérum 714 est de 300-350 ou de 200-250 unités, suivant que le titrage est fait avec la toxine E 31 ou avec la toxine E 33. Faisons remarquer, en passant, que ces deux derniers échantillons, similaires par la valeur de la dose minima mortelle (0 milligr. 045) et par la valeur de la « dose-test internationale » (1,2 et 1,3), diffèrent nettement par la valeur de la « dose-test française » (1,2 et 0,75).

La D. M. M. de la toxine P 29, obtenue à partir du bouillon ensemencé le 6 décembre, est de 0 milligr. 13 ; celle de l'échantillon E 42, préparé le lendemain, est de 0 milligr. 065.

La valeur de la « dose-test internationale » de la toxine E 42 est de 2 milligr. 55 et celle de la « dose-test française » de cet échantillon : 1 milligr. 1 ; la « dose-test internationale » de la toxine P 29 est de 3 milligr. 2 et la « dose-test française » : 3 milligrammes (tableau VII). Le sérum 415

TABLEAU VII. — Dose minima mortelle et « doses-test » de quelques échantillons de toxine *perfringens* A préparés dans le même bouillon.

BOUILLON Vf				TOXINE <i>perfringens</i> A			
Date de préparation	Date de l'ensemencement	pH		Toxine liquide TITRE (doses minima mortelles par centimètre cube)	Toxine précipitée		
		avant stérilisation	après stérilisation		numéro et dose minima mortelle de l'échantillon (milligr.)	« dose-test » internationale (milligr.)	« dose-test » française (milligr.)
juillet 1938.	21 juillet 1938.	7,7-7,8		10-15			
	28 juillet 1938.	7,7-7,8		10	0,14 0,20		
7 sept. 1939.	13 sept. 1939.	7,7-7,8	7,65	35	E ₃₄ 0,045	1,2	1,2
	15 sept. 1939.	7,7-7,8	7,7-7,8	30	E ₃₂ 0,08	1,1	0,8
	21 sept. 1939.	7,7-7,8	7,6-7,65	20	E ₃₃ 0,045	1,3	0,75
	26 sept. 1939.	7,7-7,8	7,6	40	E ₃₄ 0,035	1,05	0,65
6 oct. 1939.	12 oct. 1939.	7,7-7,8	7,65-7,7	50	E ₃₆ 0,055	1,6	1,75
	18 oct. 1939.	7,7-7,8	7,65-7,7	40	E ₃₇ 0,07	2,6	2,6
8 nov. 1939.	22 nov. 1939.	7,7-7,8	7,55	35	E ₃₉ 0,085	2,15	1,9
	29 nov. 1939.	7,7-7,8	7,65-7,7	20-30	E ₄₁ 0,065	1,9	2
				30	P ₂₈ 0,13	2,9	3,4
4 nov. 1939.	6 déc. 1939.	7,7-7,8	7,5-7,55	20-30	P ₂₉ 0,13	3,2	3
	7 déc. 1939.	7,7-7,8	7,5	40	E ₄₂ 0,065	2,55	1,15

titre 400 unités anti-P 29 et seulement 250-300 unités anti-E 42 (tableau II).

C. — *Le même bouillon, ensemencé le même jour*, dans des flacons en verre Pyrex, avec 30 cent. cubes d'une culture de quinze heures de *B. perfringens* prélevée dans des tubes apparemment identiques, t_1 et t_2 , peut fournir des toxines

dont les doses minima mortelles varient aussi du simple au double : la dose minima mortelle de la toxine E 41 est de 0 milligr. 065 et celle de la toxine P 28, préparée en même temps, est de 0 milligr. 13 (tableau VII).

Les deux toxines E 41 et P 28 ont été préparées le 29 novembre, à partir du même bouillon que nous avons réparti dans deux flacons de 5 litres en verre pyrex et dans deux tubes t 1 et t 2. Avant d'ensemencer ces deux tubes, nous les avons maintenus pendant vingt-cinq à trente minutes à 100°, puis, après les avoir laissés pendant vingt minutes dans un bain-marie à 35°, nous les avons ensemencés avec 0 c. c. 5 de culture-mère, prélevée dans l'un des 20 tubes scellés le 6 septembre 1939. (Comme d'habitude, ce tube scellé a été agité avant de l'ouvrir, pour homogénéiser la semence.) Le lendemain, nous avons ensemencé les deux flacons avec la culture-fille des tubes t 1 et t 2. La culture des flacons a été centrifugée après vingt-deux heures d'étuve à 33-34° et la toxine précipitée à la manière habituelle.

La valeur de la « dose-test » déterminée avec le sérum étalon danois est de 1 milligr. 9 dans le cas de l'échantillon de toxine E 41 et de 2 milligr. 9 dans le cas de la toxine P 28. Le sérum 714 titre 450 unités d'après les dosages faits avec la toxine E 41 et seulement 350 à 400 d'après ceux que nous avons réalisés avec la toxine P 28.

ANALYSE DES RÉSULTATS.

Nous nous sommes demandé si la divergence des résultats que nous avons obtenus au cours des expériences mentionnées dans le paragraphe B pouvait avoir pour cause le vieillissement des bouillons (61) ou les différences de pH que nous avons constatées entre quelques-uns après leur stérilisation.

Pour interpréter ceux de l'expérience rapportée dans le paragraphe C, nous avons aussitôt supposé que les cultures-filles utilisées pour ensemencer les deux flacons avaient des propriétés différentes ayant pour origine la *complexité* de la culture-mère ; nous reviendrons plus loin sur cette hypothèse.

(61) En 1931, LOCKE (A.) et MAIN (E.-R.), *J. infect. Dis.*, **48**, 1931, p. 419, ont signalé, d'une part, que la teneur des bouillons de viande en ion cuivrique dissocié diminue pendant les autoclavages répétés et aussi *au cours de la conservation* ; d'autre part, que la *production de la toxine diphtérique n'est maxima* que lorsque le rapport des quantités de cuivre et de fer dissociés dans le bouillon présente une certaine valeur. Rappelons que la notion d'un équilibre nécessaire entre les constituants du milieu pour obtenir un bon développement d'un microorganisme avait déjà été longuement étudiée par FROUIN (A.) et GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, **42**, 1928, p. 667.

Nous avons aussi supposé que des variations de pH et de rH avaient pu se produire à des taux différents (62) dans les tubes en verre ordinaire, simplement bouchés au coton, dans lesquels les cultures-filles avaient été réalisées et que ces changements avaient plus ou moins inhibé ou favorisé l'apparition de certaines des multiples propriétés du B. *perfringens* et donné lieu ainsi à des cultures-filles distinctes.

Observations relatives à l'âge du bouillon. — Le fait que la toxicité de l'échantillon E 32 (dose minima mortelle : 0 milligr. 08) est plus faible que celle de l'échantillon E 31 (D. M. M. : 0 milligr. 045) préparé deux jours plus tôt ; que celle de l'échantillon E 37 est inférieure à celle de l'échantillon E 36 obtenu six jours auparavant, pourrait faire penser que le vieillissement altère, diminue la valeur nutritive des bouillons utilisés dans la préparation de la toxine *perfringens*. Une telle généralisation n'est pas permise car l'échantillon E 33, préparé six jours après l'échantillon E 32 et huit jours après l'échantillon E 31, a la même dose minima mortelle que l'échantillon E 31 ; l'échantillon E 34 est plus toxique que l'échantillon E 33 préparé cinq jours avant, de même la toxine E 41 obtenue sept jours après la toxine E 39 est plus toxique que cette dernière.

Observations relatives au pH. — Les chiffres de la 3^{ème} colonne du tableau V montrent que l'alcalinité du bouillon qui a servi à préparer l'échantillon E 32 (pH 7,7-7,8) est, après stérilisation et avant l'ensemencement (63), plus prononcée

(62) Il est bien connu que les verres ordinaires modifient le pH des liquides qu'ils contiennent. BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et M^{lle} AMOUREUX (Ces *Annales*, **41**, 1927, p. 83) ont observé, dans ces bouillons, les variations de pH suivantes : pH avant stérilisation, 7,3 ; pH après stérilisation, 8,3-8,5. Il est possible que les tubes t 1 et t 2 utilisés dans notre expérience étaient en verres différents et qu'ils ont changé à des degrés divers la réaction du bouillon pendant la stérilisation à 110° et pendant le chauffage ultérieur à 100°. Il est possible aussi que ces deux tubes, bouchés avec un tampon de coton, étaient inégalement obturés et que, par suite, l'air a pénétré plus lentement dans l'un que dans l'autre, abaissant ainsi à des vitesses différentes le rH du bouillon dans les deux tubes.

(63) Dans nos essais, le bouillon Vf est ajusté à pH 7,7-7,8, avec de la soude, puis il est additionné de 1 gramme par litre de glucose et, enfin, stérilisé par un chauffage de vingt-cinq à trente minutes à 110°. Pendant la stérilisation, le pH varie généralement. Voici, au

que celle du bouillon, de même origine, qui a fourni la toxine E 31 (pH de ce dernier bouillon, avant l'ensemencement : 7.65). Ces différences de pH indiquent que les composés complexes qui constituaient initialement les bouillons examinés ont subi, au cours des chauffages successifs à 110° et à 190° auxquels ils ont été soumis séparément (voir page 238), des dégradations d'intensité inégale, mettant en liberté des quantités différentes de composés plus simples. Il est possible que de telles différences d'alcalinité, ainsi que les profondes modifications chimiques qu'elles révèlent, influencent suffisamment le métabolisme du *B. perfringens* pour déterminer l'élaboration de toxines distinctes, à la fois, par les valeurs de la dose minima mortelle et de la « dose-test française » (Voir tableau VII). Cependant, peut-on, dans tous les cas, admettre que les propriétés différentes des toxines dépendent uniquement du pH et de la constitution chimique des bouillons stérilisés?

Il n'existe pas de différences marquées de pH entre les bouillons de même origine ensemencés le 12 et le 18 octobre et, pourtant, les deux toxines précipitées ont des doses mortelles différentes. De même, les différences de pH des bouillons ensemencés les 6 et 7 décembre sont minimales et, néanmoins, les D. M. M. des deux toxines élaborées dans ces bouillons varient du simple au double. Sans rejeter délibérément l'hypothèse d'une corrélation entre l'activité des toxines obtenues dans ces expériences et les modifications chimiques qui accompa-

cours des 31 derniers examens que nous avons faits, les valeurs du pH des bouillons après la stérilisation : 7,5 ou 7,55 (6 bouillons) ; 7,6, 7,6-7,65 ou 7,65 (17 bouillons) ; 7,65-7,7 (4 bouillons) ; 7,7-7,8 ou 7,8 (2 bouillons) ; 7,85 (2 bouillons). Notons, en passant, que le développement est mauvais à pH 7,85. Attirons aussi l'attention sur le soin avec lequel il faut procéder à l'alcalinisation du bouillon. Il convient d'éviter une alcalinisation trop accentuée ; même si on veille à la corriger immédiatement par addition de bouillon acide, l'excès momentané d'alcalinité n'est pas sans influencer la composition du bouillon, car, rappelons-le, celui-ci est porté à la température de 60-70° pendant l'alcalinisation.

Signalons enfin que le *B. perfringens* peut se développer à pH 5,8. En titrant vingt-deux heures après l'ensemencement les toxines formées dans deux lots du même bouillon Vf, l'un à pH 7,7, l'autre à pH 5,8, nous avons constaté que les toxines obtenues avaient le même titre : 25 doses mortelles par centimètre cube.

gnent les faibles variations de pH enregistrées, on peut, pour interpréter les résultats observés, envisager aussi l'hypothèse de la complexité de la souche de *B. perfringens* que nous utilisons et supposer qu'elle contient deux ou plusieurs variétés qui, selon le bouillon, se développent plus ou moins abondamment.

Caughey (64) a isolé, à partir de cultures pures de *B. perfringens* type A, 2 variétés stables inégalement toxigènes. Orr et Reed (65), Zeissler, ont aussi différencié 2 types de colonies, dont l'une fournit des cultures plus pathogènes et plus hémolytiques que l'autre. Ostrovskaja (1933) a décrit trois sortes de colonies ; Orr, Josephson, Baker et Reed (1933) ont signalé une gamme de colonies intermédiaires entre les variétés R et S ; Roe (1934) a distingué cinq types stables et Stevens quatre (1935). Notons toutefois que Prigge (66), en comparant les propriétés hémolytiques et toxiques des milieux nutritifs à base de peptones d'origines diverses, ensemencés avec des cultures de *B. perfringens* faites à partir des colonies à bord lisse ou à bord crénelé isolées par Zeissler, n'est pas arrivé à régulariser la proportion des facteurs hémolytiques et toxiques dans les cultures. Ajoutons aussi que Kossovsky n'a pas noté de différence dans le pouvoir pathogène des formes S et R alors que d'après Basilevsky et Melnik la virulence de la forme R est nettement inférieure à celle de la forme S.

Cette vérification, que nous avons entreprise et que nous avons dû abandonner par manque de temps, mérite d'être poursuivie étant donné l'intérêt qu'elle présente au double point de vue de la production de la toxine *perfringens* et du titrage des sérums anti-*perfringens*. Pour élucider simultanément l'importance des divers facteurs que nous avons envisagés (pH, rH, complexité de la semence), nous nous proposons aussi d'étudier systématiquement les propriétés des cultures effectuées à différents pH, dans des séries de tubes en verre neutre, contenant le même bouillon et en prenant les précautions suivantes qui nous sont suggérées par les résultats des expériences du tableau VII : alcaliniser et stériliser le bouillon juste avant de le répartir dans les tubes ; modifier rapidement le pH dans une série d'entre eux ; ensemencer aussitôt avec quelques gouttes d'une culture effectuée, dans

(64) MC CAUGHEY (C. A.). *Journ. Path. a. Bact.*, **36**, 1933, p. 263.

(65) ORR (J. H.) et REED (G. B.). *Journ. Bact.*, **25**, 1933, p. 96 et 97.

(66) PRIGGE (R.). *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, **89**, 1936, p. 477 et **91**, 1937, p. 457.

un seul tube, à partir d'une cellule unique isolée au micro-manipulateur ; mettre tous les tubes à l'étuve, une partie étant bouchée au coton, l'autre partie scellée sous le vide.

Résumé et conclusions.

TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS A.

Les résultats de nos premières recherches sur le titrage des sérums anti-*perfringens* A, établissant que le titre antitoxique de ces sérums peut considérablement varier avec l'échantillon de toxine utilisé pour faire le titrage, ont été maintes fois soumis à des contrôles approfondis. Cette enquête récente a montré que la *détermination du titre antitoxique d'un même sérum anti-perfringens A, effectuée dans plusieurs laboratoires avec une « dose-test » de divers échantillons de toxine perfringens A* préparés dans le même Institut ou dans différents pays, fournit souvent des résultats extrêmement divergents.

Par exemple, le sérum anti-*perfringens* 425 contient 50 unités antitoxiques d'après les titrages effectués à Vienne avec une toxine préparée à Vienne, 63 unités avec des toxines préparées à Francfort ou à Copenhague, 400 unités d'après les titrages faits à Copenhague et à Paris avec une toxine préparée à Paris ; un sérum danois titre 50 unités vis-à-vis d'une toxine préparée à Paris et 200 unités vis-à-vis d'une toxine danoise. Le sérum 415, d'après nos titrages réalisés avec les toxines P 24, E 34 et E 41 préparées par nous, contient 100, 200 à 250 ou 550 unités.

TITRE DE LA TOXINE PERFRINGENS PRÉPARÉE DANS LE BOUILLON VF.

Nous avons utilisé une seule souche de *B. perfringens* A, la souche Lechien, pour préparer les nombreux échantillons de toxine *perfringens* que nous avons employés soit pour l'immunisation des chevaux, soit pour le titrage des sérums anti-*perfringens* ; mais tandis que chacun de nos premiers échantillons provenait de cultures réalisées en ensemençant du bouillon Vf avec cette souche aussitôt après qu'elle avait été sou-

mise à deux passages sur cobayes, les 38 derniers ont été obtenus sans *effectuer préalablement de passage sur animal* (la toxicité des cultures centrifugées au cours de ces diverses préparations a été déterminée vingt-deux heures après l'ensemencement ; titrage sur souris de 17 à 20 grammes, voie veineuse).

Les échantillons de toxine préparés à partir de la souche de *B. perfringens* ayant subi deux passages sur cobayes ont contenu 30 à 50 doses mortelles par centimètre cube dans 7 cas sur 45. Les 38 échantillons préparés avec la souche n'ayant pas subi de passages sur cobayes ont contenu, dans 21 cas sur 38, 30 à 60 doses mortelles par centimètre cube.

TOXINE PRÉCIPITÉE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

1° La dose minima mortelle moyenne de nos échantillons de toxine *perfringens* précipitée par le sulfate neutre d'ammonium pur est de 0 milligr. 08 (moyenne de 58 préparations). Pour effectuer ces précipitations nous avons fréquemment employé 625 grammes de sulfate par litre de toxine centrifugée.

2° La quantité de toxine précipitée par litre de culture centrifugée est de 0 gr. 860 (moyenne de 42 préparations) ou de 1 gr. 695 (moyenne de 13 préparations) suivant que les cultures sont réalisées à 35-36° ou à 33-34°.

Nous avons calculé, dans 28 expériences, le pourcentage de toxine précipitée par le sulfate d'ammonium : le précipité obtenu au cours de 10 expériences a contenu 67,7 à 97 p. 100 de la toxine présente dans le liquide et dans les 18 autres 15 à 67 p. 100 seulement. La quantité moyenne de toxine précipitée au cours de ces 28 préparations a été de 58 p. 100.

3° La valeur de la « dose-test » de nos échantillons de toxine *perfringens* A, déterminée avec une unité antitoxique du sérum étalon international, est en moyenne de 1 milligr. 9 (moyenne de 34 préparations).

Le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test internationale » de nos échantillons de toxine est compris le plus souvent entre 20 et 30.

4° En déterminant, au moyen du sérum étalon international et du sérum étalon français, la « dose-test » de nos échantillons récents de toxine *perfringens* A (E 31, E 32, E 33, ..., E 43), préparés à partir de bouillons Vfensemencés dans des conditions apparemment identiques, nous avons constaté que la valeur déterminée avec le sérum étalon français ne coïncide pas toujours avec la valeur précisée avec le sérum étalon international (tableau VI).

Exemple : la « dose-test » de la toxine E 34 est de 1 milligr. 05 d'après le titrage réalisé avec le sérum danois et de 0 milligr. 65 d'après la détermination faite avec le sérum français ; la « dose-test » de la toxine E 38 est de 1,9 ou de 1,3 suivant que le titrage est effectué avec le sérum danois ou avec le sérum étalon français.

5° Les différences importantes que nous avons constatées entre les valeurs de la « dose-test internationale » et de la « dose-test française » de plusieurs *échantillons de toxine perfringens préparés avec le même bouillon Vf* nous incitent à penser que la souche du B. « *perfringens* » que nous utilisons est extrêmement complexe.

6° Des échantillons de toxine qui sont comparables par la valeur de la « dose-test » déterminée avec un seul sérum étalon n'ont pas nécessairement la même constitution antigénique.

Ainsi, les toxines E 33 et E 35, neutralisées au même taux par le sérum étalon danois, semblent identiques si l'on s'en tient à la valeur de leur « dose-test internationale » qui est de 1 milligr. 3 ; elles se révèlent, en réalité, très différentes dès qu'elles sont utilisées pour rechercher le titre antitoxique d'un sérum thérapeutique et dès que l'on compare entre elles les valeurs de leur « dose-test française » ; en effet : 1° le sérum 415 titre 350 unités internationales d'après les résultats du titrage effectué avec la première de ces toxines et 450 unités d'après le titrage réalisé avec la deuxième ; 2° la « dose-test française » de la toxine E 33 est de 0,75 alors que celle de la toxine E 35 est de 1,15 lorsque les titrages sont faits avec le sérum étalon français St₃.

L'ensemble de ces observations indique nettement que les différents laboratoires devraient utiliser, pour titrer et comparer leurs sérums anti-*perfringens*, les mêmes échantillons

de *toxine complexe* (neurotoxique, hémolytique, nécrosante, etc...), ou mieux encore des *toxines monovalentes* correspondant aux antigènes essentiels de la *toxine perfringens*, tant qu'il ne sera pas possible d'adopter le même mode de préparation de cette toxine, à partir d'une cellule unique ensemencée dans un milieu synthétique chimiquement défini.

Le Gérant : G. MASSON.

